

REMARKS

It is respectfully requested that this application be reconsidered in view of the above amendments and the following remarks and that all of the claims remaining be allowed.

Amendments in the Specification

The specification has been amended to delete the reference to a hyperlink (http://www.stanford.edu/group/nolan/tutorials/retpkg_7_phx_sys.html) upon the Examiner's request. In addition, the term "DEME" has been changed to "DMEM" to correct an obvious error.

No new matter has been introduced.

Claim Amendments

Claim 1 has been amended to specify that the cell is a 293T cell. Support for this limitation can be found, for example, in original claim 10. Accordingly, claims 9 and 10 have been canceled without prejudice or disclaimer.

Claim 1 has also been amended to recite "one or more retroviral structural proteins", for which support can be found, for example, at page 4, line 34, to page 5, line 2.

Furthermore, claim 1 has been amended to recite "wherein the one or more retroviral structural proteins are selected from the group consisting of gag, pol, and env", for which support can be found, for example, in original claim 2. Consistent with this amendment, claim 2 has been canceled without prejudice or disclaimer, and claim 3 has been amended to depend from claim 1. Similarly, claims 6-8 have been amended to recite "one or more of gag, pol, and env".

Claim 11 has been amended to recite "as deposited at the National Institute of Bioscience and Human-Technology in Japan" for additional clarity. Support for this amendment can be found, for example, at page 13, lines 14-35.

Claims 1, 3-8, and 12-14 have also been amended for additional clarity by rewording claim elements as indicated.

New claims 16-28 have been added. Claims 16-20 depend directly or indirectly from claim 3, but otherwise correspond to claims 6-8, 12, and 14. Similarly, claims 21-26 correspond to claims 6-8, 12, and 14, except that these new claims ultimately depend from claim 4.

Claims 27 and 28 are based on claim 11, but otherwise correspond to claims 12 and 14.

No new matter has been added by these amendments. The Examiner is hereby requested to enter these amendments.

Applicants submit that all claim amendments presented herein or previously are made solely in the interest of expediting allowance of the claims and should not be interpreted as acquiescence to any rejections or ground of unpatentability. Applicants reserve the right to file at least one continuing application to pursue any subject matter that is canceled or removed from prosecution due to the amendments.

Information Disclosure Statement

Applicants wish to thank the Examiner for returning the signed and initialed copies of the PTO-1449 forms filed on June 25, 2002 and April 11, 2003, respectively. It is noticed that WO 98/02529 and WO 99/64568 are not initialed on these copies. Although these references are not in English, Applicants previously submitted a partial English translation for WO 99/64568 on June 25, 2002, with the reference itself. Applicants also submitted, on April 11, 2003, a computer-generated English translation for WO 98/02529, along with a European Search Report (dated February 24, 2003) to explain the relevance of the reference. Copies of WO 98/02529, WO 99/64568, and the aforementioned translations and search report are enclosed herewith for the convenience of the Examiner. Applicants respectfully request that the Examiner consider these references and return to the undersigned a copy of the PTO-1449 forms in which these references are initialed.

Objection to the Specification

The objection to the specification for containing an embedded hyperlink has been obviated by deleting the hyperlink at page 15, line 30. Therefore, withdrawal of this objection is respectfully requested.

Rejections Under 35 U.S.C. §112, Second Paragraph

The rejections of claims 1-14 under 35 U.S.C. §112, second paragraph, are respectfully traversed for the reasons set forth below.

The Office Action alleges that it is not clear whether the cell of claim 1 is a product of nature. As amended, claim 1 is directed to a 293T cell. Since the 293T cell is an established cell line, it is clear that the claimed cell is not a product of nature. In addition, the cell of claim 1 contains an expression construct in which one or more of gag, pol, and env are expressed from the EF1 α promoter. A product of nature would not contain such a man-made expression construct.

Claim 7 stands rejected for reciting the term "bound". Since claim 7 has been amended to recite "linked" instead of "bound", this rejection is now moot.

Claims 9 and 10 stand rejected for reciting "derived" from 293 and 293T cells, respectively. These claims have been canceled, and the rejection is now moot.

Accordingly, withdrawal of these rejections is respectfully requested.

Rejections Under 35 U.S.C. §112, First Paragraph

Claim 9 stands rejected under 35 U.S.C. §112, first paragraph, as allegedly not being enabled. Specifically, the Office Action alleges that the specification does not provide a repeatable method for obtaining a cell used for the production of retroviruses, and the cell does not appear to be readily available. Claim 9 has been canceled, rendering this rejection moot. Accordingly, withdrawal of this rejection is respectfully requested.

Furthermore, to the extent that this rejection may be applied to amended claim 1, Applicants submit that the specification provides a repeatable method for obtaining the cell of claim 1. Currently pending claim 1 is directed to a 293T cell used for the production of retroviruses, wherein the cell contains an expression construct comprising a DNA encoding one or more retroviral structural proteins operably linked downstream of an EFl α promoter, wherein the one or more retroviral structural proteins are selected from the group consisting of gag, pol, and env. The 293T cell, as well as its parent cell line 293, is readily available. For example, the cells can be purchased from the American Type Culture Collection (ATCC), as shown by the ATCC catalog (copies of the relevant pages from the ATCC catalog are enclosed herewith). The EFl α promoter, sequences encoding gag, pol, and env, methods of constructing expression constructs, and methods of introducing expression constructs are all disclosed in the present application or known in the art. Therefore, a person of ordinary skills can prepare the claimed cell according to teachings of the specification without undue experimentation. Thus, claim 1 is enabled.

Rejection Under 35 U.S.C. §103

The rejection of claims 1-14 under 35 U.S.C. §103(a) in view of Klatzmann et al. (WO 98/02529, equivalent to U.S. Patent Application Publication No. 2002/0123146 A1) and Hobbs et al. (Biochem. Biophys. Res. Comm. 252:368-372, 1998) is respectfully traversed for the reasons set forth below. In particular, Applicants submit that there is no motivation to combine the cited references to arrive at the claimed invention. Furthermore, the claimed invention possesses unexpected properties.

A. Lack of motivation

To properly issue a rejection under 35 U.S.C. §103, the USPTO bears the initial burden of establishing a prima facie case of obviousness by meeting certain criteria. One of these criteria is the requirement that there be some suggestion or motivation, either in the references themselves or in the knowledge generally available to one of ordinary skill in the art, to modify the reference or to combine reference teachings to arrive at the claimed invention. *In re Vaeck*, 20 USPQ 2d 1438 (Fed. Cir. 1991). As discussed in detail below, the present rejection does not adequately establish that the requisite motivation is present.

Claim 1, as amended, is directed to a 293T cell used for the production of retroviruses, wherein the cell contains an expression construct comprising a DNA encoding a retroviral structural protein operably linked downstream of an EF1 α promoter, wherein the retroviral structural protein is selected from the group consisting of gag, pol, and env. Klatzmann et al. teach so-called packaging cells that can be used to produce defective viruses carrying a transgene, including packaging cells that express the gag, pol or env gene. The Examiner correctly notes that the reference does not teach use of the EF1 α promoter, nor use of 293T cells. Hobbs et al. teach a bicistronic vector that employs the human EF1 α promoter in 293T cells. The Office Action thus alleges that one of ordinary skill in the art would have been motivated to use the promoter of Hobbs et al. in the method of Klatzmann et al., because (according to the Office Action at page 5), "Klatzmann et al. teach that any strong promoter can be used." Applicants disagree that such a motivation is present.

First, Klatzmann et al. do not say that "any strong promoter can be used." A careful reading of the text shows that the reference actually teaches that the promoter driving expression of the env gene in particular "**may** be a strong promoter such as the cytomegalovirus (CMV) promoter....It **may** also be an inducible promoter." (paragraphs 54-55) Two examples of inducible promoters are given, but the sole example of a "strong promoter" in this passage is the CMV promoter. Thus, Klatzmann et al. essentially teach expression of the env gene from either of two possible genres of promoters, a "strong promoter" or an "inducible promoter." Hobbs et al. teach use of a specific promoter, EF1 α , that can be characterized as a "strong promoter": *i.e.*, Hobbs et al. teach a species of one of the genres. Hobbs et al. disclose nothing at all about env or any other viral protein, and disclose nothing about packaging cells or retroviruses.

The issue is whether one of ordinary skill in the art would have been motivated to select the promoter of Hobbs et al., the EF1 α promoter, from the entire genres of strong promoters and inducible promoters. Pursuant to MPEP 2144.08, the following factors should be analyzed to resolve this issue:

- (a) the size of the genus;
- (b) the express teachings;

- (c) structural similarity with preferred embodiments;
- (d) similar properties or uses of structurally similar species;
- (e) predictability of the technology; and
- (f) any other teaching to support the selection of the species.

We address these in order below.

(a) Here, the size of the genus is large, because there are many strong promoters and inducible promoters known in the art.

(b)(i) The “express teachings” of Klatzmann et al. amount to a suggestion to express the env protein from either a strong promoter such as the CMV promoter, or an inducible promoter such as tetracycline-inducible promoters or RAR- β ; the CMV promoter is illustrated in Fig. 1b. Furthermore, as discussed in more detail below, Klatzmann et al.’s “express teachings” with respect to the gag and pol genes direct the reader specifically to use of an LTR as the promoter. The “strong promoter/inducible promoter” language of paragraphs 54-55 applies solely to the env gene.

(b)(ii) The “express teachings” of Hobbs et al. concern use of the EF1 α promoter for stable expression of recombinant protein in mammalian cells, for use in overproducing protein “in quantities appropriate for structure and function analysis.” There is no express teaching in Hobbs et al. relating to expression of env (or gag or pol, for that matter), nor any conception whatsoever that 293T cells expressing env from the EF1 α promoter could be used as a packaging cell line.

(c) and (d) The preferred embodiment of the genus of “strong promoters” taught by Klatzmann et al. is the CMV promoter (paragraph 54), while the preferred embodiments of the genus of “inducible promoters” are tetracycline-inducible promoters and the RAR- β promoter (paragraph 56). This reference also discloses, as a preferred embodiment for expression of the gag and pol genes, an LTR promoter. The Office Action provides no basis for concluding that there are any structural similarities whatsoever between any of these preferred embodiments and the EF1 α promoter required by all of the claims.

(e) The Office action does not provide any reason to expect that the technology of expressing the env gene is so predictable that one could assume the EF1 α promoter linked to DNA encoding env in a 293T cell would produce a useful virus packaging cell. As discussed in the present specification, prior art methods generated cell lines with stability and infection efficiency issues.

(f) Applicants can see nothing whatsoever in Klatzmann et al. to support the selection of the promoter of Hobbs et al. in the packaging cell of Klatzmann et al.

Therefore, one of ordinary skill in the art would not have been motivated to select the EF1 α promoter (as required by all of the claims) from the entire genus of strong promoters known in the art.

Furthermore, the only context in which the so-called “strong promoter” is mentioned is with respect to the env gene. Expression of the gag/pol genes is discussed elsewhere in Klatzmann et al., where it is taught that an LTR “characterized by good transcription activity” should be used to drive expression. (paragraph 43) Apparently Klatzmann et al. prefer the LTR (as opposed to some other type of promoter) for this purpose because it preserves a structure that has been optimized for production of gag/pol proteins: “These processes are optimised in the Maloney type retroviral particle and constructions intended to make the packaging cell of the invention do not affect the gag/pol LTR structure with the exception of the Ψ deletion. The choice of gag/pol (*sic*, pol) genes and of the LTRs depends on the aim to be achieved, which is to produce a large amount of defective recombinant viral particles, and as a result the largest possible expression of gag/pol genes is sought.” (paragraph 41) Klatzmann et al. give no hint that “the largest possible expression of gag/pol genes” can be achieved with any promoter other than an LTR; in fact, they imply otherwise. Hobbs et al. do not address gag and pol at all, so do not contradict this teaching of Klatzmann et al. regarding the importance of the LTR with respect to these genes. Thus, these references, even in combination, provide no motivation to seek a promoter other than an LTR for use with the gag/pol genes. Applicants note that claims 3, 4, 11, and all claims dependent thereon require that the expression construct comprise DNA encoding gag and pol, each operably

linked to an EF1 α promoter. Because there is no suggestion in the cited art to make such a construct, the rejection of these claims is unwarranted.

B. Unexpected properties

The claimed invention possesses unexpected and superior properties as described below.

The present inventors compared the activities of a number of strong promoters in 293T cells, including the SV40 promoter, SR α promoter, EF1 α promoter, TK promoter, and MuLV LTR (page 2, lines 12-17). The results indicate that the EF1 α promoter was surprisingly strong. For example, the activity of the EF1 α promoter was approximately 100-fold higher than that of the LTR, and tens of times higher than the other promoters (page 9, line 35 to page 10, line 3). This unexpected high activity could not have been predicted from the cited references or knowledge in the art. Based on these results, the EF1 α promoter was selected to prepare packaging cells.

As described in Example 8 (pages 14-15) of the specification, the PLAT-E packaging cells prepared according to the present invention produced retrovirus with an infection efficiency of 90% even after two months of passage; in contrast, prior art packaging cells (BOSC23) had dropped down to an infection efficiency of only 23% after two months. Example 10 compares PLAT-E cells to BOSC23 and another prior art packaging cell line, Phoenix-E, showing that the PLAT-E cells of the invention produced higher levels of *gag-pol* RNA, *env* mRNA, *env* protein, and reverse transcriptase activity than did the prior art cell lines. Therefore, the packaging cells of the present invention have unexpected high productivity and long-term stability. This could not have been predicted based on the cited prior art.

Since there is no motivation to combine the cited references to arrive at the claimed invention, and since the claimed invention possesses unexpected properties, the claimed invention is not obvious. Accordingly, withdrawal of this rejection is respectfully requested.

Applicant : Toshio Kitamura et al.
Serial No. : 10/009,329
Filed : April 11, 2002
Page : 15 of 15

Attorney's Docket No.: 14875-095001 / C1-105DP1PCT-US

Conclusions

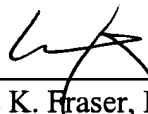
For the reasons set forth above, Applicants submit that the claims of this application are patentable. Reconsideration and withdrawal of the Examiner's objections and rejections are hereby requested. Allowance of the claims under examination in this application is earnestly solicited.

In the event that a telephone conversation could expedite the prosecution of this application, the Examiner is requested to call the undersigned at (617) 542-5070 or the undersigned's associate, Ping Hwung, at (650) 839-5044.

Enclosed is a \$72.00 check for excess fees and a \$950.00 check for the Petition for Extension of Time fee. Please apply any other charges or credits to deposit account 06-1050.

Respectfully submitted,

Date: Sept. 9, 2004


for Janis K. Fraser, Ph.D., J.D. Reg. No. 44,164
Reg. No. 34,819

Fish & Richardson P.C.
225 Franklin Street
Boston, MA 02110-2804
Telephone: (617) 542-5070
Facsimile: (617) 542-8906



Your Discoveries
Begin with US.™



Search:

[Home](#) || [Ordering Info](#) || [Quick Order](#) || [Cart](#) || [Tech Support](#)

Search

Before submitting an order you will be asked to read and accept the terms and conditions of ATCC's [Material Transfer Agreement](#) or, in certain cases, an MTA specified by the depositing institution.

Customers in Europe, Australia, Japan, Korea, New Zealand and Taiwan must contact a [local distributor](#) for pricing information and to place an order for ATCC cultures and products.

Cell Lines	
ATCC Number: CRL-1573	Price: \$179.00
	
Designation: 293	Depositors: FL Graham
Biosafety Level: 2	Shipped: frozen
Medium & Serum: See Propagation	Growth Properties: adherent
Organism: <i>Homo sapiens</i> (human)	Morphology: epithelial
	
Tissue: kidney; transformed with adenovirus 5 DNA	
Permits/Forms: In addition to the MTA mentioned above, other ATCC and/or regulatory permits may be required for the transfer of this ATCC material. Anyone purchasing ATCC material is ultimately responsible for obtaining the permits. Please click here for information regarding the specific requirements for shipment to your location.	
<u>Related Cell Culture Products</u>	
Comments:	<p>Although an earlier report suggested that the cells contained Adenovirus 5 DNA from both the right and left ends of the viral genome [RF32764], it is now clear that only left end sequences are present. [39768]</p> <p>The line is excellent for titrating human adenoviruses.</p> <p>The cell line does not adhere to the substrate when left at room temperature for any length of time, therefore, live cultures may be received with the cells detached.</p> <p>The cells will re-attach to the flask over a period of several days in culture at 37C.</p> <p>The cells express an unusual cell surface receptor for vitronectin composed of the integrin beta-1 subunit and the vitronectin receptor alpha-v subunit. [23406]</p> <p>The Ad5 insert was cloned and sequenced, and it was determined that a colinear segment from nts 1 to 4344 is integrated into chromosome 19 (19q13.2). [39768]</p> <p>These cells are distributed for research purposes only. 293 cells, their products, or their derivatives may not be distributed to third parties.</p>
Receptors:	vitronectin, expressed

Tumorigenic:	Yes, forms tumors in nude mice
DNA Profile (STR):	Amelogenin: X CSF1PO: 11,12 D13S317: 12,14 D16S539: 9,13 D5S818: 8,9 D7S820: 11,12 TH01: 7,9.3 TPOX: 11 vWA: 16,19
Cytogenetic Analysis:	This is a hypotriploid human cell line. The modal chromosome number was 64, occurring in 30% of cells. The rate of cells with higher ploidies was 4.2 %. The der(1)t(1;15) (q42;q13), der(19)t(3;19) (q12;q13), der(12)t(8;12) (q22;p13), and four other marker chromosomes were common to most cells. Five other markers occurred in some cells only. The marker der(1) and M8 (or Xq+) were often paired. There were four copies of N17 and N22. Noticeably in addition to three copies of X chromosomes, there were paired Xq+, and a single Xp+ in most cells.
Age:	fetus
Propagation:	ATCC complete growth medium: Minimum essential medium (Eagle) with 2 mM L-glutamine and Earle's BSS adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate, 0.1 mM non-essential amino acids, and 1.0 mM sodium pyruvate, 90%; heat-inactivated horse serum, 10% Temperature: 37.0 C
Subculturing:	Protocol: <ol style="list-style-type: none"> 1. Remove and discard culture medium. 2. Briefly rinse the cell layer with 0.25% (w/v) Trypsin- 0.53 mM EDTA solution to remove all traces of serum that contains trypsin inhibitor. 3. Add 2.0 to 3.0 ml of Trypsin-EDTA solution to flask and observe cells under an inverted microscope until cell layer is dispersed (usually within 5 to 15 minutes). Note: To avoid clumping do not agitate the cells by hitting or shaking the flask while waiting for the cells to detach. Cells that are difficult to detach may be placed at 37°C to facilitate dispersal. 4. Add 6.0 to 8.0 ml of complete growth medium and aspirate cells by gently pipetting. 5. Subcultivation Ratio: A subcultivation ratio of 1:2 to 1:4 is recommended Medium Renewal: Every 2 to 3 days
Freeze Medium:	Complete growth medium 95%; DMSO, 5% Storage temperature: liquid nitrogen vapor phase
Related Products:	Recommended medium (without the additional supplements or serum described under ATCC Medium) - ATCC 30-2003 derivative - ATCC CRL-10852 derivative - ATCC CRL-12006 derivative - ATCC CRL-12007 derivative - ATCC CRL-12013 derivative - ATCC CRL-12479 derivative - ATCC CRL-2029 derivative - ATCC CRL-2368 purified DNA - ATCC CRL-1573D
References:	21624 : Xie QW , et al. Complementation analysis of mutants of nitric oxide synthase reveals that the active site requires two hemes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 4891-4896, 1996. PubMed: 8643499 21631 : Da Costa LT , et al. Converting cancer genes into killer genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 4192-4196, 1996. PubMed: 8633039 22282 : Graham FL , et al. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J. Gen. Virol. 36: 59-72, 1977. PubMed: 886304 22319 : Graham FL , et al. Defective transforming capacity of adenovirus type 5 host-range mutants. Virology 86: 10-21, 1978. PubMed: 664220 22699 : Harrison T , et al. Host-range mutants of adenovirus type 5 defective for growth in HeLa cells. Virology 77: 319-329, 1977. PubMed: 841862 23406 : Bodary SC , McLean JW . The integrin beta 1 subunit associates with the vitronectin receptor alpha v subunit to form a novel vitronectin receptor in a human embryonic kidney cell line. J. Biol. Chem. 265: 5938-5941, 1990. PubMed: 1690718 27819 : Goodrum FD , Ornelles DA . The early region 1B 55-kilodalton oncoprotein of

adenovirus relieves growth restrictions imposed on viral replication by the cell cycle. J. Virol. 71: 548-561, 1997. PubMed: [8985383](#)

[28301](#): Loffler S , et al. CD9, a tetraspan transmembrane protein, renders cells susceptible to canine distemper virus. J. Virol. 71: 42-49, 1997. PubMed: [8985321](#)

[32283](#): Hu SX , et al. Development of an adenovirus vector with tetracycline-regulatable human tumor necrosis factor alpha gene expression. Cancer Res. 57: 3339-3343, 1997. PubMed: [9269991](#)

[32396](#): Kolanus W , et al. alphaLbeta2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1 a cytoplasmic regulatory molecule. Cell 86: 233-242, 1996. PubMed: [8706128](#)

[32490](#): Stauderman KA , et al. Characterization of human recombinant neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit combinations alpha 2 beta 4, alpha 3 beta 4 and alpha 4 beta 4 stably expressed in HEK293 cells. J. Pharmacol. Exp. Ther. 284: 777-789, 1998. PubMed: [9454827](#)

[32514](#): Bartz SR , et al. Human immunodeficiency virus type 1 cell cycle control: Vpr is cytostatic and mediates G2 accumulation by a mechanism which differs from DNA damage checkpoint control. J. Virol. 70: 2324-2331, 1996. PubMed: [8642659](#)

[32726](#): Sandri-Goldin RM , Hibbard MK . The herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 coimmunoprecipitates with anti-sm antiserum, and the C terminus appears to be required for this interaction. J. Virol. 70: 108-118, 1996. PubMed: [8523514](#)

[32829](#): Ansieau S , et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-1, TRAF-2, and TRAF-3 interact in vivo with the CD30 cytoplasmic domain; TRAF-2 mediates CD30-induced nuclear factor kappa B activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14053-14058, 1996. PubMed: [8943059](#)

[32893](#): Zhang J , et al. Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. J. Biol. Chem. 271: 18302-18305, 1996. PubMed: [8702465](#)

[32914](#): Oppermann M , et al. Monoclonal antibodies reveal receptor specificity among G-protein-coupled receptor kinases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7649-7654, 1996. PubMed: [8755530](#)

[32921](#): Xia Y , et al. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 6770-6774, 1996. PubMed: [8692893](#)

[32925](#): Zhu X , et al. Cell cycle-dependent modulation of telomerase activity in tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 6091-6095, 1996. PubMed: [8650224](#)

[32971](#): Uebele VN , et al. Functional differences in Kv1.5 currents expressed in mammalian cell lines are due to the presence of endogenous Kvbeta2.1 subunits. J. Biol. Chem. 271: 2406-2412, 1996. PubMed: [8576199](#)

[33003](#): Abell A , et al. Deletions of portions of the extracellular loops of the lutropin/choriogonadotropin receptor decrease the binding affinity for ovine luteinizing hormone, but not human choriogonadotropin, by preventing the formation of mature cell surface receptor. J. Biol. Chem. 271: 4518-4527, 1996. PubMed: [8626807](#)

[33010](#): Tiberi M , et al. Differential regulation of dopamine D1A receptor responsiveness by various G protein-coupled receptor kinases. J. Biol. Chem. 271: 3771-3778, 1996. PubMed: [8631993](#)

[33022](#): Shahrestanifar M , et al. Studies on inhibition of mu and delta opioid receptor binding by dithiothreitol and N-ethylmaleimide. His223 is critical for mu opioid receptor binding and inactivation by N-ethylmaleimide. J. Biol. Chem. 271: 5505-5512, 1996. PubMed: [8621408](#)

[33035](#): Boring L , et al. Molecular cloning and functional expression of murine JE (monocyte chemoattractant protein 1) and murine macrophage inflammatory protein 1alpha receptors. J. Biol. Chem. 271: 7551-7558, 1996. PubMed: [8631787](#)

[33036](#): Noonberg SB , et al. Evidence of post-transcriptional regulation of U6 small nuclear RNA. J. Biol. Chem. 271: 10477-10481, 1996. PubMed: [8631843](#)

[33050](#): Fox JC , Shanley JR . Antisense inhibition of basic fibroblast growth factor induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. J. Biol. Chem. 271: 12578-12584, 1996. PubMed: [8647868](#)

[33056](#): Lee MJ , et al. The inducible G protein-coupled receptor edg-1 signals via the Gi/mitogen-activated protein kinase pathway. J. Biol. Chem. 271: 11272-11279, 1996. PubMed: [8626678](#)

[33123](#): Marchand P , et al. Cysteine mutations in the MAM domain result in monomeric meprin and alter stability and activity of the proteinase. J. Biol. Chem. 271: 24236-24241, 1996. PubMed: [8798668](#)

[33137](#): Arai H , Charo IF . Differential regulation of G-protein-mediated signaling by chemokine receptors. J. Biol. Chem. 271: 21814-21819, 1996. PubMed: [8702980](#)

[33138](#): Huang Q , et al. Substrate recognition by tissue factor-factor VIIa. J. Biol. Chem. 271: 21752-21757, 1996. PubMed: [8702971](#)

[33157](#): Montecarlo FS , Charo IF . The amino-terminal extracellular domain of the MCP-1 receptor, but not the RANTES/MIP-1alpha receptor, confers chemokine selectivity. J. Biol.

Chem. 271: 19084-19092, 1996. PubMed: [8702581](#)
[33158](#): Keith DE , et al. Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. J. Biol. Chem. 271: 19021-19024, 1996. PubMed: [8702570](#)
[39768](#): Louis N , et al. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. Virology 233: 423-429, 1997. PubMed: [9217065](#)
[61259](#): Shaw G , et al. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK **293** cells. FASEB J. 16: 869-871, 2002. PubMed: [11967234](#)

Notices and Disclaimers

ATCC products are intended for laboratory research purposes only. They are not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this site, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

All prices are listed in U.S. dollars and are subject to change without notice. A discount off the current list price will be applied to most cultures for nonprofit institutions in the United States and Canada. Cultures that are ordered as test tubes or flasks will carry an additional laboratory fee. Fees for permits, shipping, and handling may apply.

You may continue your word search in Cell Lines by typing in your search criteria below or returning to the [Cell Lines menu](#). To search another product line, choose one from the dropdown box at the top. For complex searches using boolean operators, the following characters must be used: & (for AND), | (for OR), ^ (for AND NOT). An asterisk (*) is used as the wildcard. For more information please review the [Search Help](#).

For query options, please read the [search help](#).

Home Page Archive

[Home](#) [Ordering Info](#) [Quick Order](#) [Support](#) [About ATCC](#) [Contact Us](#)
[Privacy Policy](#) [Terms of Use](#) [ATCC MTA](#)

© 2004 American Type Culture Collection (ATCC).
All rights reserved.



Your Discoveries
Begin with US.™

Search: --- Choose Op

[Home](#) || [Ordering Info](#) || [Quick Order](#) || [Cart](#) || [Tech Support](#)

Search

Before submitting an order you will be asked to read and accept the terms and conditions of ATCC's [Material Transfer Agreement](#) or, in certain cases, an MTA specified by the depositing institution.

Customers in Europe, Australia, Japan, Korea, New Zealand and Taiwan must contact a [local distributor](#) for pricing information and to place an order for ATCC cultures and products.

Cell Lines	
ATCC Number: CRL-11268	Price: \$179.00
Order this item	
Designation: 293T/17	Depositors: Rockefeller Univ.
Biosafety Level: 2	Shipped: frozen
Medium & Serum: See Propagation	Growth Properties: adherent
Organism: <i>Homo sapiens</i> (human)	Morphology: epithelial
Tissue: kidney	
Permits/Forms: In addition to the MTA mentioned above, other ATCC and/or regulatory permits may be required for the transfer of this ATCC material. Anyone purchasing ATCC material is ultimately responsible for obtaining the permits. Please click here for information regarding the specific requirements for shipment to your location.	
This material is cited in a U.S. and/or other Patent or Patent Application, and may not be used to infringe on the patent claims.	
Related Cell Culture Products	
Comments:	The 293T/17 cell line is a derivative of the 293T (293tsA1609neo) cell line. 293T is a highly transfectable derivative of the 293 cell line into which the temperature sensitive gene for SV40 T-antigen was inserted. 293T cells were cloned and the clones tested with the pBND and pZAP vectors to obtain a line capable of producing high titers of infectious retrovirus, 293T/17. These cells constitutively express the simian virus 40 (SV40) large T antigen, and clone 17 was selected specifically for its high transfectability. 293T/17 cells were cotransfected with the pCRIPenv- and the pCRIPgag-2 vectors to obtain the ANJOU 65 (see ATCC CRL-11269) cell line. ANJOU 65 cells were cotransfected with the pCRIPgag-2 and pGPT2E vectors to obtain the BOSC 23 (see ATCC CRL-11270) ecotropic envelope-expression packaging cell line. ANJOU 65 cells were also cotransfected with the pCRIPAMgag vector along with a plasmid expressing the gpt resistance gene to obtain the Bing (see ATCC CRL-11554) amphotropic envelope-expression packaging cell line.
Antigen Expression:	SV40 T antigen [45408]

Age:	fetus
Propagation:	ATCC complete growth medium: Dulbecco's modified Eagle's medium with 4 mM L-glutamine adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate and 4.5 g/L glucose, 90%; fetal bovine serum, 10% Temperature: 37.0 C
Subculturing:	Protocol: <ol style="list-style-type: none"> 1. Remove and discard culture medium. 2. Briefly rinse the cell layer with 0.25% (w/v) Trypsin- 0.53 mM EDTA solution to remove all traces of serum that contains trypsin inhibitor. 3. Add 2.0 to 3.0 ml of Trypsin-EDTA solution to flask and observe cells under an inverted microscope until cell layer is dispersed (usually within 5 to 15 minutes). Note: To avoid clumping do not agitate the cells by hitting or shaking the flask while waiting for the cells to detach. Cells that are difficult to detach may be placed at 37°C to facilitate dispersal. 4. Add 6.0 to 8.0 ml of complete growth medium and aspirate cells by gently pipetting. 5. Add appropriate aliquots of the cell suspension to new culture vessels. 6. Incubate cultures at 37°C. Subcultivation Ratio: A subcultivation ratio of 1:4 to 1:8 is recommended Medium Renewal: Every 2 to 3 days
Freeze Medium:	Complete growth medium supplemented with 5% (v/v) DMSO Storage temperature: liquid nitrogen vapor phase
Related Products:	Recommended medium (without the additional supplements or serum described under ATCC Medium) - ATCC 30-2002 recommended serum - ATCC 30-2020 derivative - ATCC CRL-11269
References:	45408 : Sena-Esteves M , et al. Single-step conversion of cells to retrovirus vector producers with herpes simplex virus-Epstein-Barr virus hybrid amplicons. J. Virol. 73: 10426-10439, 1999. PubMed: 10559361 57446 : Pensiero M , et al. Retroviral vectors produced by producer cell lines resistant to lysis by human serum. US Patent 5,952,225 dated Sep 14 1999 57447 : Pensiero M , et al. Retroviral vectors produced by producer cell lines resistant to lysis by human serum. US Patent 6,329,199 dated Dec 11 2001 57448 : Pear WS , et al. Production of High-Titer Helper-Free Retroviruses by Transient Transfection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8392-8396, 1993. PubMed: 7690960

Notices and Disclaimers

ATCC products are intended for laboratory research purposes only. They are not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this site, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

All prices are listed in U.S. dollars and are subject to change without notice. A discount off the current list price will be applied to most cultures for nonprofit institutions in the United States and Canada. Cultures that are ordered as test tubes or flasks will carry an additional laboratory fee. Fees for permits, shipping, and handling may apply.

You may continue your word search in Cell Lines by typing in your search criteria below or returning to the [Cell Lines menu](#). To search another product line, choose one from the dropdown box at the top. For complex searches using boolean operators, the following characters must be used: & (for AND), | (for OR), ^ (for AND NOT). An asterisk (*) is used as the wildcard. For more information please review the [Search Help](#).

For query options, please read the [search help](#).

Home Page Archive

[Home](#) [Ordering Info](#) [Quick Order](#) [Support](#) [About ATCC](#) [Contact Us](#)
[Privacy Policy](#) [Terms of Use](#) [ATCC MTA](#)

© 2004 American Type Culture Collection (ATCC).
All rights reserved.

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 5/10, 15/86	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/64568 (43) Date de publication internationale: 16 décembre 1999 (16.12.99)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01353</p> <p>(22) Date de dépôt international: 8 juin 1999 (08.06.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/07185 8 juin 1998 (08.06.98) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): UNIVERSITE DE NANTES [FR/FR]; Présidence de l'Université, 1, quai de Tourville, Boîte postale 13622, F-44035 Nantes Cedex 01 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DUISIT, Ghislaine [FR/FR]; 2, allée de la Tremperie, F-44000 Nantes (FR). SALVETTI, Anna [FR/FR]; 15, avenue Chanzy, F-44000 Nantes (FR). MOULLIER, Philippe [FR/FR]; 1, impasse de la Grillonnais, F-44115 Basse Goulaine (FR). COSSET, François-Loïc [FR/FR]; 30, Grande rue de la Guillotière, F-69007 Lyon (FR).</p> <p>(74) Mandataires: ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD S.A. etc.; 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i></p>	
<p>(54) Title: PACKAGING KIT</p> <p>(54) Titre: KIT D'ENCAPSIDATION</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a method for elaborating a cell line capable of producing in transient and/or stable manner recombinant retroviruses, of an order not less than 10⁶ UI/ml, and a kit for implementing said method. Said kit contains at least a non retroviral virus and a retrovirus.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne un procédé pour l'établissement d'une lignée cellulaire apte à produire des rétrovirus recombinants de façon transitoire et/ou stable, à un titre au moins égal à 10⁶ UI/ml, et un kit pour la mise en oeuvre du procédé. Ce dernier contient au moins un virus non rétroviral et un rétrovirus.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

KIT D'ENCAPSIDATION

La présente invention concerne un procédé pour l'établissement de lignées cellulaires eucaryotes hautement productrices de particules rétrovirales de manière stable ou transitoire. Elle porte également sur une trousse permettant l'encapsidation rétrovirale ainsi que sur une trousse pour l'établissement d'une lignée productrice de rétrovirus.

La production de rétrovirus recombinants et défectifs pour leur réplication est une approche très attractive dans l'établissement de vecteurs pour la thérapie génique. En effet, un des objectifs de cette approche thérapeutique est la modification stable des cellules cibles. A cet effet, de nombreux vecteurs rétroviraux ont été développés basés sur l'aptitude des virus à assurer une expression stable dans les cellules qu'ils infectent. Tous les systèmes développés jusqu'à présent ont leurs avantages et leurs limites. Il s'agit essentiellement des systèmes rétroviraux et des systèmes adénoviraux.

Les rétrovirus qui présentent l'avantage d'une intégration stable dans les cellules cibles, avantage tant pour la persistance de l'expression que pour la sécurité de l'utilisation, présentent des limites et des inconvénients :

- le titre des particules infectieuses produites par les cellules d'empaquetage reste limité ;

- par ailleurs, les rétrovirus n'infectent pas les cellules quiescentes, ce qui limite leur expression à des cellules en division. En outre, on observe une efficacité médiocre du transfert de gènes in vivo.

Une des raisons évoquées en est une activation rapide du complément du sérum entraînant l'inactivation des particules virales. Cet inconvénient peut être surmonté par la production rétrovirale in situ par greffage des cellules productrices (Rollins, S.A. et al 1996, Human gene Therapy 7:619-626). La génération in situ de vecteurs rétroviraux a

également été effectuée par une infection transitoire des cellules cibles avec des vecteurs rétroviraux avec un plasmide porteur des fonctions rétrovirales ; par exemple, P. Noguez-Hellin et al (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93 : 41) ont décrit le transfert in situ de vecteurs rétroviraux et des éléments d'emballage par injection directe d'ADN plasmidique porteurs de séquences rétrovirales défectives (plasmovirus).

Les cellules cibles transfectées par le plasmovirus se transforment en cellules productrices de rétrovirus infectieux défectifs après transfection par une cassette d'expression porteuse des séquences absentes du vecteur rétroviral. Cette approche associe la simplicité d'utilisation des plasmides avec l'infectivité et l'expression à long terme des rétrovirus tout en apportant un taux de propagation compatible avec l'utilisation thérapeutique.

Cette approche, qui a l'avantage de permettre d'améliorer l'efficacité du transfert de gènes, nécessite une mise au point longue et fastidieuse pour isoler les producteurs efficaces lorsque l'on cherche à optimiser un système de production au regard d'un transgène donné. Elle est donc peu adaptée aux utilisations ponctuelles ou sur cellules primaires, en recherche comme en clinique.

Des productions de rétrovirus à haut titre peuvent être obtenues à partir de lignées productrices stables (Davis J.L., 1997, Human Gene Therapy 8, 1459-67, 1997). Les cellules d'emballage, qui expriment de façon stable les protéines de structure gag-pol et env, sont transférées par un plasmide porteur des vecteurs génomiques et sélectionnées pour leur capacité de production de rétrovirus. Néanmoins, les sous-clones présentent une grande variété dans les titres obtenus et leur sélection requiert des mois de travail. Une méthode alternative consiste à obtenir une production de particules rétrovirales transitoires par transfection dans des cellules d'emballage, soit du vecteur directement,

soit des trois plasmides porteurs respectivement de gag-pol, env. et le génome viral.

Les titres de production obtenus sont malgré tout trop faibles et différentes stratégies ont été développées pour augmenter au moins l'expression transitoire des gènes. On peut citer : LANDAU, N.R., et al., 1992, J. VIROL. 66, 5110-5113, et SONEOKA, Y. et al, 1995, N.A.R., 23, 628-633.

Une nouvelle approche a été développée récemment visant à introduire un grand nombre de copies des plasmides dans les cellules productrices. Les auteurs utilisent une chimère du virus Semliki Forest (SFV) (Li et al., 1998, PNAS, 95, 3650) du virus Herpes simplex (HSV) : (SAVARD et al., 1997, J. VIROL. 71, 4111) ou de l'adénovirus portant le gène gag-pol, env et/ou le vecteur. Néanmoins, la capacité à produire des rétrovirus recombinants diffère selon les systèmes, selon leur toxicité respective vis-à-vis de la cellule productrice.

Par ailleurs, il est bien connu que l'utilisation de vecteurs adénoviraux permet d'obtenir un taux élevé de transfert de gènes dans différentes cellules cibles. Ces vecteurs sont limités par la durée de l'expression du transgène du fait qu'ils ne s'intègrent pas dans le génome de la cellule cible et donc sont rapidement perdus dans les descendances des cellules transfectées. Ils présentent en outre le risque de produire par recombinaison des adénovirus réplicatifs.

Feng et al (1997, Nature Biotechnology, 15: 866) ont récemment développé un système de vecteur chimérique dans lequel les avantages des vecteurs adénoviraux et rétroviraux sont combinés pour l'obtention d'une transduction stable et d'une bonne productivité in vivo. Cela est réalisé par l'induction de la formation de cellules productrices de rétrovirus in situ par transfert d'un vecteur adéno-rétroviral et des fonctions d'emballage rétrovirales.

Cette approche visait à réaliser des cellules cibles capables de produire des rétrovirus in vivo, eux-mêmes capables d'infecter les cellules voisines. Néanmoins, aucun élément quantitatif n'est donné en faveur d'une bonne productivité de particules rétrovirales.

5 La présente invention vise à fournir les outils à l'homme du métier qui souhaite obtenir une production rapide et à haut rendement de particules rétrovirales porteuses d'un transgène d'intérêt et dans des conditions de sécurité satisfaisantes.

10 La présente invention résulte du besoin des scientifiques d'optimiser rapidement la production des particules rétrovirales porteuses d'un transgène, partant du fait que l'expression stable d'un transgène dans les cellules cibles était de préférence recherchée, expression qui passe par une intégration dudit transgène dans la cellule hôte, et donc par l'utilisation de rétrovirus recombinants. Il fallait donc associer différents moyens et
15 proposer un protocole d'utilisation de ces moyens qui permette au scientifique, en recherche comme en clinique, de générer et de caractériser rapidement le système producteur le mieux adapté au transgène d'une part, et aux cellules cibles d'autre part.

20 Dans l'ensemble du texte qui suit, les termes utilisés auront les définitions suivantes :

TRANSGENE signifie toute séquence hétérologue codant pour une protéine de structure ou une protéine enzymatique ou combinaison de gènes dont l'expression est recherchée dans une cellule cible pour quelque raison que ce soit.

25 VIRUS ou PARTICULE VIRALE DEFECTIVE est un virus ou une particule virale incapable de réplication autonome.

TRANSFERT d'une séquence d'acide nucléique porteur de gènes recombinants dans une cellule désigne collectivement la transfection de ladite cellule par un vecteur ou plasmide contenant des gènes

recombinants ou l'infection de ladite cellule par un virus dont le génome contient ces mêmes gènes recombinants.

La présente invention porte sur un procédé de production de rétrovirus recombinants défectifs à haut titre par infection ou transfection in vivo de cellules cibles, par des virus ou des vecteurs viraux porteurs de séquences rétrovirales, caractérisé en ce que le ou les vecteurs viraux ou les virus sont d'origine adénovirale ou baculovirale. Elle porte également sur un procédé pour l'établissement d'une lignée cellulaire apte à produire des particules rétrovirales à haut titre et dans des conditions de sécurité satisfaisante, après infection ou transfection de ces cellules par un virus ou un plasmide porteur d'un vecteur rétroviral desdites cellules.

Le procédé de l'invention permet, soit d'obtenir une lignée exprimant le vecteur rétroviral transitoirement, ou de manière stable sous la forme d'un clone ou d'une population cellulaire et permettant une expression transitoire des particules rétrovirales.

L'invention porte également sur une lignée cellulaire hépatique et sur son utilisation dans le procédé de l'invention.

La présente invention porte également sur une trousse pour l'obtention et la production de particules rétrovirales porteuses d'un transgène et comprenant au moins :

- un adénovirus porteur des fonctions rétrovirales gag-pol sous la forme d'une ou plusieurs ampoules permettant plusieurs manipulations distinctes à des concentrations variables ;
- un adénovirus porteur d'un gène env, présenté sous la même forme ; le gène env peut être d'origine diverse. Il peut être écotrope, xénotrope ou amphotrope. Il peut provenir par exemple du RD44 (virus de chat), du GaLV (virus de Gibbon) ou du VSV-G (virus de la stomatite vésiculaire). Il peut également être issu de la protéine G du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV-G) et sous le contrôle du promoteur CMV, ou d'un promoteur inductible. Il peut être issu enfin de l'enveloppe des

rétrovirus amphotrope "10 A1" ou tout type d'enveloppes ciblantes, chimériques etc.

- un plasmide portant le vecteur rétroviral, c'est-à-dire les séquences régulatrices contenant les LTR, la région d'encapsidation, avec des sites multiples de clonage pour insérer le transgène. Il peut contenir de plus, si nécessaire :

. une origine de réplication de type SV40 et un marqueur de sélection de type néomycine, blasticidine ou autre ;

. un plasmide contrôle portant le vecteur rétroviral contenant un gène rapporteur comme le gène LacZ pour vérifier la qualité de la manipulation.

Le rationnel des procédés et des kits de l'invention est le suivant :

Les systèmes de production classiques passent par la sélection de lignées cellulaires exprimant de façon stable le vecteur et les fonctions d'encapsidation. Cette méthode peut durer plusieurs mois, et nécessite l'analyse de nombreux clones pour isoler les producteurs efficaces. Si elle permet l'obtention de surnageants de culture infectieux à un titre raisonnable (10^6 à 10^7 particules infectieuses par ml), elle restreint néanmoins l'établissement de producteurs aux lignées cellulaires transformées. Elle est donc peu adaptée aux utilisations ponctuelles ou sur des cellules primaires que ce soit en recherche ou en clinique.

Un autre système de production utilisé est la production en transitoire, qui est plus souple et plus rapide, en permettant dès le lendemain de la transfection des cellules cibles avec les plasmides portant les fonctions d'encapsidation et le vecteur, de recueillir un surnageant. Mais cette approche permet d'atteindre des titres seulement de l'ordre de 10^3 à 10^4 particules infectieuses par ml, exceptionnellement 10^5 .

Les inventeurs ont donc cherché à fournir un système permettant, d'une part de sélectionner rapidement une lignée cellulaire

bonne productrice et, d'autre part, de produire des particules rétrovirales défectives à haut titre porteuses du transgène et sans émergence de virus compétent pour la réplication, et ce :

- soit en travaillant à partir d'une population cellulaire ou un clone exprimant le vecteur rétroviral en transitoire ;
- soit une population cellulaire ou un clone l'exprimant de façon stable.

Le vecteur rétroviral, porteur du transgène, des régions régulatrices du rétrovirus et des fonctions d'encapsidation, peut être introduit, soit par transfection des cellules par un plasmide porteur du vecteur, soit par infection par des particules rétrovirales dont le génome est porteur des séquences équivalentes.

L'expression transitoire est obtenue quasiment immédiatement après transfection du plasmide porteur du vecteur alors que l'expression stable est obtenue après deux semaines au moins de culture en milieu sélectif après transfection du plasmide porteur du vecteur ou après infection simple.

La production de particules rétrovirales par ces cellules ainsi transfectées ou infectées est réalisée en apportant les fonctions d'encapsidation rétrovirale au moyen d'un virus recombinant non rétroviral. A titre d'exemple de virus particulièrement appropriés à la mise en oeuvre du procédé de l'invention, on peut citer les baculovirus ou les adénovirus. L'infection, bien plus performante que la transfection, permet de toucher l'ensemble des cellules avec un nombre élevé de copies introduites. Ce dernier point a été jusqu'à présent suspecté être un facteur limitant dans les systèmes de production transitoire.

Pour des questions de sécurité, un mode de réalisation préféré est de placer les fonctions d'encapsidation rétrovirale gal-pol et env sur deux virus distincts. De la même façon, pour augmenter encore la sécurité du système, il est préférable de limiter les risques de

recombinaison entre la fin de pol et le début de env (régions chevauchantes chez Moloney-Murine Leukemia virus (MoMLV) avec émergence de virus "helper", les unités gag-pol, d'une part, et env, d'autre part proviennent de virus différents. A titre d'exemple, gag-pol peut être
5 issu de MoMLV alors que env peut provenir du virus de Gibbon (GaLV) ou du virus de chat (RD 114). Malgré une faible homologie de séquence, les virus chimériques associant gag-pol, d'une part, et env, d'autre part, d'origines différentes restent parfaitement infectieux.

Description détaillée de l'invention :

10 L'invention porte sur un procédé de production de rétrovirus recombinants porteurs de gènes d'intérêt à un titre égal ou supérieur à 10^6 UI/ml, comprenant :

(a) sélection d'une lignée cellulaire eucaryote susceptible à l'infection virale,

15 (b) transfection par un vecteur porteur d'un gène d'intérêt sous le contrôle de séquences régulatrices rétrovirales et porteur de la séquence d'encapsidation, et dépourvue des gènes de structure du rétrovirus, ou infection par une particule rétrovirale dont le génome est porteur des mêmes séquences que ledit vecteur,

20 (c) infection de ladite lignée par au moins un virus recombinant dépourvu de séquence psi et apportant les séquences rétrovirales gag-pol et env, gag-pol et env étant de préférence issues de rétrovirus différents, ou transfection par au moins un vecteur adénoviral porteur des mêmes séquences,

25 (d) la culture de ces cellules dans un milieu approprié à la récolte des particules rétrovirales porteuses du transgène.

Dans ce procédé, le ou les vecteurs viraux ou les virus sont de préférence d'origine adénovirale ou baculovirale.

Dans la présente invention, gag-pol peut notamment être issu
30 d'un lentivirus tel que le SIV (virus simien de l'immunodéficience).

Les séquences régulatrices et les séquences d'encapsidation rétrovirales du plasmide ou dans le virus décrit en b) sont de préférence issues de rétrovirus murins, et de lentivirus caprins, félins ou primates.

5 Le principe de base de l'invention est la constitution de vecteurs adénoviraux porteurs des séquences codant pour les fonctions rétrovirales. Dans l'ensemble du texte, il est bien entendu que, à chaque fois qu'il sera question d'adénovirus, de vecteur adénoviral, il pourra être
10 entendu de la même façon les équivalents fonctionnels de ces virus ou de ces vecteurs. Plus particulièrement, le baculovirus ou les vecteurs baculoviraux pourront être utilisés de la même façon que les adénovirus.

L'ensemble des fonctions rétrovirales, associé à un transgène, est transféré dans la cellule cible, simultanément ou séquentiellement, en utilisant les systèmes de transfection ou d'infection des vecteurs adénoviraux ou des adénovirus.

15 Les gènes accessoires des rétrovirus, à savoir tat, rev, vif, vpr, vpt peuvent être inclus ou exclus de la construction chimérique. L'exclusion ajoute à la sécurité virale du système.

Les fonctions virales d'encapsidation gag-pol et env. peuvent être portées par un seul vecteur adénoviral.

20 Cela présente néanmoins l'inconvénient de diminuer la flexibilité du kit. En effet, si env est porté par un vecteur séparé, il est possible de faire varier la nature du rétrovirus produit par les cellules en faisant varier l'origine du gène env introduit, ce qui n'est pas le cas quand les différentes fonctions sont portées par le même vecteur.

25 Aussi, un mode de réalisation préféré est-il de faire porter les éléments rétroviraux par trois vecteurs viraux distincts :

- le premier porteur des séquences régulatrices incluant le LTR, les séquences d'encapsidation Ψ ou un équivalent fonctionnel, et le transgène introduit de manière appropriée au niveau des sites de
30 restriction prévus à cet effet ;

- un vecteur viral porteur du gène gag-pol et un vecteur viral porteur du gène env.

Par vecteur viral, on entend de préférence un vecteur adénoviral ou un vecteur baculoviral, dont les structures et les performances sont bien documentées. Néanmoins, tout autre virus non
5 intégratif doit être considéré comme un équivalent fonctionnel d'un tel virus. L'homme du métier comprendra que tout virus capable d'infecter une cellule cible avec une multiplicité d'infections faible et capable d'exprimer les fonctions portées par son génome dans ladite cellule cible doit être
10 considéré comme équivalent fonctionnel de l'adénovirus. Aussi, dans le texte ci-après, on parlera de préférence de vecteur adénoviral, ou d'adénovirus.

Dans l'ensemble du texte, et afin d'alléger ce dernier, il est entendu que quand il sera question de vecteur adénoviral, il faudra
15 comprendre tant le vecteur lui-même administrable par transfection à la cellule cible que le virus contenant un génome porteur des mêmes séquences administrable par infection de la cellule cible.

De la même façon, par vecteur rétroviral susceptible de transfecter la cellule cible, il faudra entendre tant le vecteur administrable
20 par transfection que la particule virale dont le génome porte les mêmes séquences que le vecteur en question.

Dans le procédé ci-dessus, les étapes b) et c) peuvent être simultanées ou successives.

En effet, si l'on cherche à avoir un système de production de
25 particules rétrovirales transitoire, les trois vecteurs peuvent être transférés simultanément (ou les trois virus infecter les cellules simultanément). Si le titre obtenu est plus faible que celui obtenu après une expression stable, l'avantage est que la réponse sur le choix de la cellule cible est quasi-instantanée.

On peut également mettre au point un système d'expression stable par, dans un premier temps, transfection ou infection par le vecteur porteur du vecteur rétroviral (étape (b)), puis, après une quinzaine de jours, après intégration stable dans le génome dudit vecteur, la cellule cible peut
5 être infectée ou transfectée par les adénovirus ou les vecteurs adénoviraux porteurs des gènes de structure du rétrovirus (étape (c)). Les étapes (b) et (c) du procédé sont alors successives.

Dans le procédé de l'invention, les gènes gag-pol et env sont sous le contrôle de promoteurs susceptibles d'être activés dans la cellule
10 cible. On pourra choisir par exemple le promoteur du CMV pour gag-pol, le promoteur EF1 α pour env. L'homme du métier pourra sélectionner tout promoteur connu pour son efficacité dans la transcription des séquences qu'il contrôle.

Le transgène quant à lui sera sous le contrôle de séquences
15 régulatrices rétrovirales contenant les LTR, ou sous le contrôle d'un promoteur interne de type P.GK (Phospho glycerate kinase).

L'invention porte également sur un procédé pour établir une lignée cellulaire eucaryote apte à produire des particules rétrovirales à un titre supérieur à 10⁶ UI par ml et comprenant les étapes de :

20 (a) sélection d'une lignée cellulaire eucaryote susceptible à l'infection virale ;

(b) transfection par un vecteur rétroviral porteur d'un transgène sous le contrôle de séquences régulatrices rétrovirales et porteur de la séquence d'encapsidation, et dépourvue des gènes de
25 structure du rétrovirus, ou infection par une particule rétrovirale dont le génome est porteur des séquences équivalentes ;

(c) infection de ladite lignée par au moins un virus recombinant dépourvu de séquence d'encapsidation et porteur de séquences rétrovirales gag-pol et env, gag-pol et env étant de préférence

issues de rétrovirus différents, ou transfection par au moins un vecteur adénoviral porteur des mêmes séquences ;

(d) criblage des lignées productrices au titre recherché, sur la base du titre en rétrovirus obtenu dans le surnageant cellulaire.

5 Dans ce cas, le transgène présent dans le vecteur rétroviral sera de préférence un gène rapporteur permettant de sélectionner et de mesurer rapidement les lignées cellulaires produisant les rétrovirus au titre souhaité.

10 Comme pour le procédé de production décrit ci-dessus, les étapes b) et c) peuvent être simultanées ou successives selon que le procédé utilise une expression transitoire ou une expression stable du vecteur rétroviral dans les cellules cibles. Pour le criblage des lignées productrices, une expression transitoire sera recherchée.

15 De la même façon, afin d'éviter toute recombinaison homologue, les séquences portées par les adénovirus gag-pol, d'une part, et env, d'autre part, sont portées par deux adénovirus distincts et sont de préférence d'origine rétrovirale différente. Pour mettre en oeuvre le procédé de l'invention, l'étape préalable était la constitution et caractérisation fonctionnelle des adénovirus porteurs de gag-pol, d'une
20 part, et des adénovirus porteurs de env, d'autre part. La méthodologie d'obtention de ces virus ou de ces vecteurs adénoviraux est exposée ci-après dans les exemples. Des adénovirus recombinants particulièrement avantageux selon l'invention sont ceux dans lesquels gag-pol est issu du MoMLV et env est issu du rétrovirus GaLV (Gibbon Ape Lekemia virus). Le
25 gène env du virus de chat RD114 est également un bon candidat pour obtenir une reconstitution virale à haut titre et sans génération de virus "helper".

Un adénovirus ou vecteur adénoviral porteur de séquences rétrovirales sont appelés adéno-rétrovirus ou vecteur adénorétroviral.

Les adéno-rétrovirus recombinants utilisables dans les procédés de l'invention seront toujours sélectionnés par :

- la titration des surnageants rétroviraux obtenus après infection des cellules productrices, et son optimisation en fonction de la multiplicité d'infections adénovirales ;

- l'absence de rétrovirus "helper" dans le surnageant de production.

Toute combinaison gag-pol et env. sur un ou deux vecteurs adénoviraux, quelle que soit l'origine des gènes rétroviraux, qu'il y ait présence ou non d'une origine de réplication du SV 40 ou d'un site de polyadénylation ou de tout autre site utilisé de façon classique pour améliorer les performances des vecteurs ou des virus recombinants seront toujours criblés au vu des deux paramètres ci-dessus : titre et/ou absence de rétrovirus helper.

Dans les procédés de l'invention, toutes les cellules susceptibles à l'infection virale ou à la transfection peuvent être des bons candidats pour utiliser le procédé de production ou de criblage. Néanmoins, les capacités de production des cellules présentent une grande variabilité sans que l'origine de cette variabilité puisse être déterminée. Les cellules HeLA (ATCC n° CCL-2) et surtout les cellules hépatiques, dont un exemple est donné par les lignées d'hépatocarcinome HuH7 (NAKABAYASHI, H. et al., 1982, Cancer Research 42, 3858-3863) apparaissent être des producteurs particulièrement efficaces ; on peut également citer la lignée Ht 1080 CRL-8805 ; en revanche, un très faible transfert de gènes a été détecté en utilisant les cellules A549 (ATCC n° CCL-185.1).

L'invention porte également sur les lignées cellulaires hépatiques transfectées ou transformées par un vecteur rétroviral porteur des fonctions d'encapsidation et dépourvu des gènes de structures rétroviraux. Ledit vecteur peut être porteur d'un transgène dont l'expression

est recherchée dans une cellule cible, le transgène étant soit un gène d'intérêt pour la thérapie génique, soit un gène rapporteur pour des études, ou optimisation d'un procédé.

5 Dans le choix des cellules cibles, certaines lignées hépatiques apparaissent comme particulièrement performantes. Il s'agit des lignées HuH7 et Ht 1080 citées plus haut ou les lignées Hep 3B ou HEP G2, et dans lesquelles les vecteurs recombinants ont été transférés.

De manière plus générale, les lignées embryonnaires sont de bons candidats dans les procédés et kits selon l'invention.

10 L'utilisation de la lignée HuH7 dans les deux procédés décrits ci-dessus fait également partie de l'invention.

L'invention porte également sur une trousse pour la production de particules rétrovirales porteuses d'un transgène et comprenant au moins :

15 (a) un récipient contenant un adénovirus ou un plasmide adénoviral porteur d'un gène gag-pol ;

(b) un ou plusieurs récipients contenant un adénovirus ou un plasmide adénoviral porteur d'un gène env ;

20 (c) un ou plusieurs récipients contenant un plasmide porteur d'un vecteur rétroviral, ou contenant un rétrovirus défectif ou un virus non rétroviral contenant au moins la séquence d'encapsulation, les séquences régulatrices, et des sites multiples de restriction permettant l'insertion d'un transgène ;

25 (d) le cas échéant, un récipient contenant un plasmide contrôle porteur d'un vecteur rétroviral, contenant au moins un gène rapporteur.

Dans la trousse selon l'invention les virus ou les plasmides en a), b), c) ou d) ci-dessus sont de préférence sous forme congelée mais peuvent également être sous forme lyophilisée.

La trousse étant destinée à mettre en oeuvre le procédé décrit ci-dessus, les différentes possibilités de construction décrites plus haut sont bien sûr les modes préférés des plasmides ou des virus présents dans la trousse de l'invention, à savoir que gag-pol, d'une part, et env, d'autre part, sont issus de rétrovirus différents. Par exemple, gag-pol est issu de MoMLV et sous le contrôle du promoteur cytomégalovirus alors que env est issu de GaLV et est sous le contrôle du promoteur de EF1 α . Les séquences régulatrices et les séquences d'encapsidation rétrovirales du plasmide ou dans le virus décrit en c) sont de préférence issues de rétrovirus murins, et de lentivirus caprins, félins ou primates.

Enfin, le plasmide en c) porteur du vecteur rétroviral contient de préférence un marqueur de sélection.

Une trousse similaire pour l'établissement d'une lignée productrice de particules rétrovirales fait également partie de l'invention. Elle comprend au moins :

- (a) un récipient contenant un adénovirus ou un plasmide adénoviral porteur d'un gène gag-pol ;
- (b) un ou plusieurs récipients contenant un adénovirus ou un plasmide adénoviral porteur d'un gène env ;
- (c) un ou plusieurs récipients contenant un plasmide porteur d'un vecteur rétroviral, ou contenant un rétrovirus défectif ou un virus non rétroviral contenant au moins la séquence d'encapsidation, les séquences régulatrices, et un gène rapporteur.

La souplesse d'utilisation des kits selon l'invention résulte entre autres du choix des cellules productrices. Toutes les cellules susceptibles à la transfection par les plasmides ou l'infection par les virus et plus particulièrement par les adénovirus et par les baculovirus peuvent être utilisées.

Plusieurs versions du kit peuvent être disponibles selon le choix de l'enveloppe rétrovirale choisie par l'utilisateur :

Il pourra s'agir d'un kit amphotrope lorsque l'adénovirus env correspondra à une enveloppe de l'amphotrope. Il peut également s'agir d'un kit GaLV lorsque l'adénovirus env codera pour l'enveloppe du rétrovirus de Gibbon. Il en est de même pour l'enveloppe RD 114, ECO, XENO ainsi que l'adénovirus codant pour l'enveloppe VSV-G.

Plusieurs conditionnements peuvent être proposés en fonction de la quantité des surnageants souhaitée :

- un kit mini comprenant 1 à 5 10^9 pfu pour chaque adénovirus et permettant l'obtention de 50 ml de surnageants infectieux ;
- un kit "maxi" contenant 1 à 5 10^{10} pfu pour chaque adénovirus et permettant l'obtention de 500 ml de surnageants infectieux ;
- un kit "méga" contenant 5 à 10 10^{11} pfu pour chaque adénovirus et permettant l'obtention de 2 l de surnageants infectieux.

L'utilisation des kits selon l'invention peut se faire de plusieurs manières :

- 1) Il peut permettre de créer une population de cellules exprimant en stable le vecteur rétroviral porteur du transgène. Le plasmide est alors transfecté de préférence avec un marqueur de sélection de type néomycine ou blasticidine. Au bout de deux semaines de culture en présence de la drogue, la population est constituée. Si le transgène code pour une protéine visualisable en cytométrie de flux, elle peut être triée plus avant.

- Après quoi, la lignée exprimant de façon stable le vecteur rétroviral sera infectée par les adénovirus d'encapsidation gag-pol, d'une part, et env, d'autre part, contenus dans les récipients en a) et b) ci-dessus. Le lendemain, le milieu de culture est changé. Il est recueilli, filtré et prêt à être utilisé le jour d'après et tous les jours pendant quatre jours.

2) Le vecteur rétroviral est transfecté dans les cellules choisies au moment de la co-infection avec les adénovirus d'encapsulation. Le milieu de culture est changé le lendemain et le surnageant est recueilli 24 heures après. Les cellules cibles qui présentent alors une expression transitoire permettent néanmoins très rapidement de connaître les capacités de production de ces cellules.

Les procédés et les kits de l'invention sont avantageusement utilisés dans les cas suivants :

(a) production de vecteurs en temps limité et à faible coût : la flexibilité du kit et la rapidité d'obtention des résultats en fait un outil de choix pour les scientifiques cherchant à produire des rétrovirus recombinants ;

(b) application au transfert de gènes ex vivo, par exemple dans des cellules hématopoïétiques. Les cellules souches hématopoïétiques du sang périphérique sont considérées comme des cibles importantes pour les approches de thérapie génique liées au traitement des désordres hématologiques, incluant les maladies héréditaires. En particulier, cette approche est largement utilisée avec l'objectif de traiter par thérapie génique les tumeurs ou les cancers, après la mobilisation du système avec le GCSF. L'application du kit selon l'invention au transfert de gènes dans les cellules souches hématopoïétiques de type CD34+ peut permettre de combiner les avantages de deux systèmes de co-culture :

- celui des cellules souches CD34+ sur un tapis de cellules stromales créant un micro-environnement médullaire producteur de cytokines (Nolta, Chi.A. et al, Blood 86:101-110, 1995) ;

- co-culture des cellules souches hématopoïétiques avec des cellules productrices de rétrovirus réalisée selon le procédé de l'invention et favorisant la transduction par contact direct cellule-cellule (Germeraad W.T., et al, Blood, 84:780-788, 1994).

En pratique, un stroma humain primaire sera cultivé in vitro en respectant sa capacité à soutenir l'hématopoïèse. Il sera ensuite infecté avec les adénovirus portant les fonctions d'encapsidation et le vecteur pour le rendre producteur de particules rétrovirales infectieuses. La transduction des CD34+ sera alors réalisée par co-culture des cellules souches sur le tapis stromal génétiquement modifié, en l'absence de cytokines exogènes.

Les matériels et méthodes, protocoles et exemples ci-après pourront, sans être limitatifs, montrer la performance des procédés de l'invention et des kits pour la sélection de cellules hautement productrices de rétrovirus recombinants.

Légendes des figures

La Figure 1 représente le vecteur MoMLV gag-pol.

La Figure 2 représente le gène env de GALV sous le contrôle du promoteur du facteur humain d'élongation EF1 α .

La Figure 3 représente le mCD2 inséré dans le vecteur rétroviral, sous le contrôle d'un LTR.

La Figure 4 représente un Western Blot réalisé avec un anticorps anti-p30 sur des extraits cellulaires indiquant la synthèse de la protéine gag-pol après infection par l'adénovirus gag-pol.

La Figure 5 représente le Western Blot obtenu avec un anticorps anti-gp70 exprimant la synthèse de la protéine d'enveloppe après infection par l'adénovirus env.

La Figure 6 représente les profits obtenus en cytométrie de flux des cellules exprimant le mCD2 en fonction de la multiplicité d'infection. Des surnageants de culture de cellules Te-FLY-GALV infectées par AdmCD2 ont été utilisés pour transduire mCD2 dans les cellules Te671.

La Figure 7 représente les profits en cytométrie de flux obtenus après infection de différents types de lignées cellulaires, soit deux jours après l'infection (Figure 7A), soit 21 jours après l'infection (Figure 7B).

Matériels et Méthodes

Constructions adénovirales portant les séquences rétrovirales

Les fonctions d'encapsidation gag-pol et env, le marqueur d'infection adénovirale et le vecteur rétroviral ont été clonés indépendamment les uns des autres, entre deux sites de restriction
5 uniques. Les différentes cassettes peuvent donc être sorties facilement des plasmides intermédiaires pour être ensuite insérées dans les plasmides navettes définitifs.

Une cassette d'expression pour la chaîne α du récepteur à l'interleukine 2 sera associée à la cassette gag-pol (il s'agit de la chaîne
10 courte du récepteur membranaire qui n'est pas capable de déclencher, seule, une réponse intracellulaire après fixation de l'IL2). Elle permettra de suivre l'infection adénovirale.

Construction des cassettes d'expression gag-pol

En fait, trois unités différentes ont été construites, pour pallier
15 à d'éventuelles interférences entre les épissages différentiels adénovirus/rétrovirus. Toutes sont dépourvues du signal d'encapsidation ψ . Deux d'entre elles sont également dépourvues du site donneur d'épissage (sd^+), avec délétion ou non du site accepteur (sa^- et sa^+) situé à la fin de
20 pol.

Lignées cellulaires utilisées

Les lignées cellulaires A549, HuH7, HeLa, HT1080, 293, ont déjà été décrites et font l'objet de dépôt à l'ATCC. Les cellules Te671 et leurs clones dérivés transcomplémentants ont été décrits dans COSSET,
25 F.L., et al., 1995 J. Virol., 69, 7430-7436. Brièvement, TeLFBASAF exprime de manière stable les protéines d'enveloppe amphotrope et le vecteur rétroviral LacZ. TeLCeB6 exprime de manière stable tant les protéines gag-pol de Mo-MLV que le vecteur LacZ. TeLacZ exprime uniquement le vecteur rétroviral LacZ. TeFLY-GALV exprime le gène gag-pol de Mo-MLV et la protéine d'enveloppe GALV. Finalement, les lignées
30

cellulaires TG18 produisent des particules rétrovirales du pseudo type GALV codant pour la protéine nucléaire LacZ. Toutes ces cellules sont mises en culture dans du milieu de DMEM, Sigma (milieu Eagle modifié par Dulbecco) supplémenté en 10 % de sérum de veau foetal. Les cellules Vero sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Gibco BRL) supplémenté avec 5 % de sérum de veau foetal.

Les plasmides

Le plasmide navette de base pAd-Swal est dérivé du vecteur adénoviral pAd-BgIII, et est constitué de l'ITR en 5' et des séquences d'encapsulation (1-400 pb) suivies par la région 9-16 mu de l'adénovirus humain type 5. Le polylinker NotI-EcoRV extrait du vecteur pAd-CMVlink a été inséré à la place du site BgIII. Finalement, un site de restriction Swal a été introduit en amont de l'ITR en 5'. Le plasmide peut ainsi être linéarisé par Swal ou NheI.

La cassette d'expression gag-pol a été dans un premier temps sous-clonée dans le plasmide Bluescript BS-KS+ II (Stratagene) pour donner le plasmide pBGP. La région NotI-EcoRI du plasmide hCMV-intron gag-pol, incluant le promoteur, le gène rétroviral et le gène de résistance à l'antibiotique blasticidin *bsr* (Cosset et al, 1995) a été inséré dans les sites correspondants de BS (plasmide pBGP-*bsr*). Le signal de polyadénylation de SV40 a été amplifié par PCR à partir du plasmide hCMV-intron gag-pol en utilisant les amorces suivantes :

5'-GGATCGATCTAGAGATCATAATCAGCC et

3'-GGGAATTCGATCCAGACATGATAAG,

dans le but d'introduire les sites de restriction *ClaI* et *EcoRI*. Un fragment pol de 472 pb a été obtenu par PCR avec le plasmide précédent comme matrice et en utilisant les amorces suivantes :

5'-GGATTCCGAGCCCGCAACACG (précédant le site accepteur de d'épissage) et 3'-ATCGATTAGGGGGCCTCGCGGG, conférant un site *ClaI* en aval du codon stop de pol. Ce fragment a été digéré avec *SfiI* et *ClaI*,

alors que le signal de polyadénylation de SV40 a été digéré avec *ClaI* et *EcoRI*. Ils ont été insérés par une ligation des deux fragments de PCR dans le plasmide pBGP-bsr, digéré par *SfiI-EcoRI*, à la place du gène *bsr*. Cette unité gag-pol de 6,4 kb a finalement été extraite de pBGP avec *NotI* et *EcoRI*, modifiée par l'ADN I polymérase de Klenow et insérée dans le plasmide *BamHI*, digéré avec pAd-Swal en utilisant des linkers *BclI*.

Le promoteur humain EF1 α inclut le premier exon non codant, un intron et la partie 5' du deuxième exon coupé en aval du site ATG. Le promoteur a été extrait avec *HindIII* et *XbaI* du plasmide pKREFhu, et cloné dans les sites correspondants du plasmide pSP72 (PROMEGA). Le signal de polyadénylation décrit ci-dessus a été inséré aux sites *XbaI* et *EcoRI*.

Le plasmide pEGA exprimant le gène env de GALV a été digéré avec *SacII*, traité à la polymérase de Klenow et ligué avec des linkers *XbaI*. Le gène de 2,1 kb a ensuite été extrait avec *XbaI* et inséré entre le promoteur HuEF1 α et le signal de polyadénylation de SV40 pour donner le plasmide pCE. Cette unité de 4 kb a été finalement extraite avec *HindIII* et *ClaI*, traitée à la polymérase de Klenow et insérée dans le plasmide pAd-Swal digéré par *BamHI* en utilisant les linkers *BclI*.

Les vecteurs rétroviraux MFG contenant le CD2 murin ont déjà été décrits (DRANOFF, G., et al., 1993, P.N.A.S., 90, 3539-3543). Le vecteur de 4 kb a été extrait par *SspI* et inséré dans le plasmide pAd-Swal digéré par *BamHI* en utilisant les linkers *BclI*.

Construction des adénovirus recombinants

Les adénovirus recombinants délétés E1/E3 ont été réalisés en utilisant le mutant adénoviral dl327 contenant une délétion complète de la région E3. En bref, 10 μ g de plasmide navette ont été linéarisés avec, soit *SwaI* ou *NheI* et co-transfectés dans les cellules 293 avec 2 μ g d'ADN, de dl327 digéré par *ClaI*. Chaque adénovirus recombinant a ensuite été purifié par quatre cycles de purification en plaques et confirmé par des tests de production fonctionnels tels que décrits ci-dessous. Des virus

compétents pour la réplication sont finalement propagés sur des cellules 293 et purifiés deux fois par centrifugation en gradient de chlorure de césium. La concentration des particules virales par ml a été déterminée par spectrophotométrie. Les stocks d'adénovirus ont été titrés en plaques en infectant des cellules 293 avec des dilutions en série dans du milieu DMEM supplémenté avec 2 % de sérum de veau pendant deux heures. Les milieux sont ensuite éliminés avant le recouvrement par les virus. Le nombre d'unités formant plaques par ml (pfu/ml) a été compté six jours plus tard.

Mesures de la production de rétrovirus

Les tests de production de particules rétrovirales sont réalisés par infection des cellules de pré-packaging par les adénovirus recombinants. Les cellules TeLCeB6, qui expriment en stable le vecteur NLS LacZ et la région gag-pol, sont infectées par l'adénovirus recombinant portant l'enveloppe et le vecteur rétroviral. De la même façon, les cellules TeLFBASF, qui expriment en stable le vecteur NLS LacZ et l'enveloppe amphotrope, sont infectées par les adénovirus portant la région gag-pol.

Ces cellules de pré-packaging sontensemencées à $4 \cdot 10^5$ cellules par puits dans des plaques à 6 puits. Le lendemain, elles sont infectées par les adénovirus recombinants à différentes multiplicités d'infection (MOI) pendant deux heures dans 1 ml de milieu DMEM contenant 2 % de sérum de veau foetal. Les cellules sont ensuite lavées une fois avec du PBS, et laissées dans 2 ml de DMEM contenant 10 % de sérum de veau foetal pendant 24 heures supplémentaires. Les cellules sont changées pour la nuit. Finalement, deux jours après l'infection avec les adénovirus, les surnageants de culture sont récoltés, filtrés à $0,45 \mu\text{m}$ et analysés pour la présence de particules rétrovirales infectieuses. Les cellules productrices sont analysées quant à leur production de protéines gag, env ou CD2. Dans un autre mode de réalisation, les cellules infectées

peuvent être maintenues en culture pour des essais de production rétrovirale à long terme.

Titration des vecteurs codant pour NlsLacZ

Pour le titrage des particules rétrovirales codant pour NlsLacZ, des cellules Te671 ont étéensemencées à 5×10^4 cellules par puits dans des plaques à 24 puits la veille de la transduction. Elles sont incubées pendant quatre heures avec des dilutions en série des surnageants infectieux contenant 8 μg de Polybrene par ml. Après changement du milieu de culture, les cellules sont laissées pendant deux jours. Elles sont ensuite fixées avec 2 % de glutaraldéhyde et colorées avec 5 mM $\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ -5 mM $\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ -2 mM MgCl_2 -1 mg/ml de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside) (Promega) pendant 6 heures. Le nombre des colonies positives est compté en unités internationales par ml (IU/ml).

Cytométrie de flux

Les cellules productrices infectées avec des adénovirus recombinants porteurs du MFGmCD2 sont récoltées dans du PBS, 2 mM EDTA et incubées avec 1 $\mu\text{g}/10^6$ cellules avec un anticorps monoclonal purifié de rat contre le CD2 de souris (Cliniscience) pendant 1 heure, à 4°C. Les cellules sont ensuite incubées avec 1 $\mu\text{g}/10^6$ cellules de fragment F(ab')₂ purifié conjugué au FITC et dirigé contre les IgG de rat (Bioatlantique, France) pendant 1 heure, à 4 °C. Après le dernier lavage en PBS, elles sont colorées avec 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de iodure de propidium (PI), pour discriminer la population viable (PI négative) des cellules mortes (PI positive) conduisant à la réduction du bruit de fond de fluorescence non spécifique. Le marquage au FITC de 10^4 cellules viables est analysée par cytométrie de flux.

Western blotting

Des lysats cellulaires sont préparés dans un tampon de lyse (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 %, Triton X100, sodium dodecyl sulfate 0,5 %, 30

sodium deoxycholate 0,5 %, 150 mM NaCl, 1 mM phénylméthylsulfonyl
fluoride, 1X d'un cocktail inhibiteur de protéases (Boehringer Mannheim).
Après une séparation en électrophorèse de gel de polyacrylamide en
sodium dodécyl sulfate 10 % et transfert sur des membranes de nitro-
cellulose Hybond (Amersham), l'immunoblot a été réalisé en utilisant un
anticorps monoclonal anti-p30 (?) ou un anticorps monoclonal anti-gp70
amphotrope. Des anti-anticorps de chèvre marqués à la peroxydase ont été
utilisés pour l'immuno-détection en chimio-luminescence.

Exemples de réalisation

Exemple 1

Caractérisation fonctionnelle des adénovirus porteurs de gag-pol (Ad gag-pol)

(a) Obtention des adénovirus recombinants

Pour éviter une éventuelle interférence entre les deux
systèmes d'épissage viraux contraire à la production des adénovirus
recombinants, deux cassettes d'expression gag-pol ont été construites. La
première porte la séquence nucléique sauvage de Moloney MLV (gag-pol
SA+), et la deuxième porte une séquence modifiée au niveau du site
accepteur d'épissage présent à la fin de pol mais respectant le cadre de
lecture normal (gag-pol SA-). Le gène gag-pol de Mo-MLV est placé sous
le contrôle du promoteur précoce du cytomégalovirus (CMV). Cet
ensemble est inséré au site de la région E1 du génome adénoviral,
conduisant à des virus défectifs pour sa réplication. Plusieurs clones
adénoviraux ont été obtenus après co-transfection des cellules 293 (E1+)
avec les plasmides navettes et le génome Ad327 tronqué de la partie
5'ITR. Huit d'entre eux ont été testés dans les essais de production
rétrovirale, après infection des cellules trans-complémentantes Tel-
FBASAF, qui expriment en stable l'enveloppe amphotrope et le vecteur
NisLacZ. Tous étaient positifs. Le clone 3 (Adgag-pol SA+) et le clone 6
(Adgag-pol SA-) ont été purifiés par quatre plaquings successifs sur les

cellules 293. L'amplification finale sur 20 boîtes de culture de 150 mm a permis l'obtention de deux stocks d'adénovirus titrant indifféremment à $5,0 \cdot 10^{10}$ pfu/ml. La présence du site accepteur d'épissage sauvage n'a donc finalement pas d'effet négatif sur la production adénovirale. Les virus
5 seront désignés par la suite sous la forme générique Adgag-pol.

(b) Production des particules rétrovirales

Les tests de production de particules rétrovirales après infection par Adgag-pol ont été analysés en infectant des cellules trans-complémentantes TeLBASAF, dérivées des Te671 et exprimant en stable
10 l'enveloppe amphotrope et le vecteur LacZ. Les conditions optimales de production rétrovirale ont été déterminées par infection des cellules TeLBASAF avec des quantités croissantes d'Adgag-pol. Deux jours après l'infection, les niveaux d'expression de gag-pol ont été analysés par Western Blot en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine de capsid
15 p30. L'anticorps permet également l'immuno-détection du précurseur non clivé de gag Pr65 ou des polypeptides partiellement digérés. Les niveaux de la synthèse de Pr65 dans les cellules infectées par Adgag-pol sont au moins égaux à ceux détectés dans les cellules d'empaquetage stable FLY-GALV, cellules dérivées des Te671 exprimant gag-pol et l'enveloppe du
20 Gibbon ape leukemia virus GALV (Porter CD, C.M., Tailor CS, Parkar MH, Cosset FL, Weiss RA, Takeuchi Y., Hum. Gene Ther. 7, 913-919 (1996)). La synthèse de la Pr65 augmente avec la m.o.i. lorsqu'on travaille avec de faibles quantités d'adénovirus (m.o.i. de 5 à 10). Cette observation peut s'expliquer par un nombre croissant de cellules réellement transduites. La
25 figure 4 représente le Western Blot réalisé avec un anticorps anti-p30 sur les extraits cellulaires (10^5 cellules par piste). La piste (+) est un contrôle positif TeFLY-GALV. La piste (-) est un contrôle négatif TeL-FBASAF non infectées. Les pistes 5 à 50 indiquent le résultat obtenu avec TeL-FBASAF infectées avec m.o.i. croissantes en Ad gag-pol.

Par contre, la quantité de Pr65 produite reste stable pour des m.o.i. variant jusqu'à 250. Ce résultat, indépendant de l'effet cytopathique observé pour les m.o.i. plus fortes, est plus inattendu.

La production des rétrovirus par les TelfBASAF infectées par l'Ad gag-pol a été analysée par titration des surnageants de culture selon la technique décrite ci-dessus dans Matériels et Méthodes.

Le titre obtenu est approximativement de 10^6 Ifu/ml, pour des m.o.i. variant de 10 à 500 en adénovirus (tableau 1 ci-dessous). Il est maximal les deuxième et troisième jours après infection des producteurs (colonnes J2 et J3) quelle que soit la quantité d'Adgag-pol utilisée. Il décroît à partir du quatrième jour (colonne J4), même aux m.o.i. les plus faibles pour lesquelles un effet cytopathique n'est pas observé.

Tableau 1 : Production de particules rétrovirales avec l'adénovirus Ad gag-pol

m.o.i. en Adénovirus Adgag-pol	Titre J1 p.i.	Titre J2 p.i.	Titre J3 p.i.	Titre J4 p.i.
ADN	$1,7 \cdot 10^3$	$9,0 \cdot 10^2$	$5,2 \cdot 10^2$	$3,6 \cdot 10^2$
10	$4,3 \cdot 10^5$	$7,5 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^6$	$8,6 \cdot 10^5$
50	$1,4 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$	$3,1 \cdot 10^5$
100	$1,2 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^6$	$4,6 \cdot 10^5$
250	$1,4 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^6$	$9,0 \cdot 10^5$	$\text{inf } 10^4$
500	$1,3 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^6$	$7,7 \cdot 10^5$	$\text{inf } 10^4$

On observe également une saturation de la production de particules rétrovirales à partir de la m.o.i. 50. Est-elle due à la saturation de la synthèse des protéines gag remarquée en Western Blot, ou le système

TeL-FBASAF est-il lui-même limitant ? Quel que soit le facteur responsable de la saturation, cette méthode de production transitoire augmente le titre des surnageants infectieux d'un facteur 100 à 1000 par rapport à la simple transfection du plasmide portant la cassette d'expression de gag-pol dans les cellules complémentaires (ligne DNA).

La recherche de rétrovirus compétents pour la réplication sur les surnageants TeL-FBASAF infectées n'a montré aucun événement de recombinaison entre la cassette gag-pol et l'enveloppe intégrée dans le génome cellulaire (travaux réalisés par F.L. Cossett, Lyon). Les tests ont pourtant été faits dans les conditions les plus favorables à l'émergence de virus helper : grand nombre de copies gag-pol présentes dans les cellules, et utilisation de l'enveloppe amphotrope de MLV dont la séquence nucléique chevauche avec celle de pol. De même, aucune encapsidation non spécifique de l'ARN gag-pol n'a pu être mise en évidence dans les surnageants de culture. Le système de production est donc efficace, rapide et sûr.

Exemple 2

Caractérisation fonctionnelle des adénovirus portant la fonction env

1. Obtention et purification des adénovirus recombinants

Le gène codant pour l'enveloppe de GALV (fragment SacII-XbaI SacII-XbaI) a été cloné entre le promoteur du facteur d'élongation humain EF1a (issu du plasmide pKREFhu (référence)) (Fig. 2). La production d'adénovirus recombinants permet d'obtenir des titres de l'ordre 2×10^{11} pfu/ml.

La génération d'adénovirus portant la cassette d'expression de l'enveloppe GALV et le vecteur VL30-mCD2 s'étant avérée délicate, les deux fonctions ont été placées sur des vecteurs adénoviraux distincts.

Pour construire le vecteur porteur de mCD2 et représenté sur la figure 3, la région psi/SD+/SA+ du vecteur MFG-mCD2 a été remplacée

par la région d'encapsidation et dimérisation de rétro-transposons virus-like VL30 (fragment XbaI-BamHA, issu du plasmide pCO6-HX (figure 3)).

2. Production de particules rétrovirales

Des stocks d'adénovirus titrant à $2,0 \cdot 10^{11}$ pfu/ml ont été obtenus.

L'analyse de l'adénovirus Ad GALVenv est analogue à celle faite sur l'adénovirus Ad gag-pol. Les cellules complémentantes sont les TeLCeb6, dérivées des Te671 exprimant en stable gag-pol de MoMLV et le vecteur MFG-LacZ (Cosset F.L. et al, J. Virol. 1995, 69:7430-7436).

La synthèse de l'enveloppe a été étudiée par Western Blot et le résultat représenté sur la figure 5 qui représente le Western Blot réalisé avec un anticorps anti-gp70 amphotrope sur des extraits cellulaires (10^5 cellules par piste). Dans la Figure 5A, la piste (+) est un contrôle positif TeFLY-GALV. La piste (-) est TeL-Ceb6 non infectées. Les pistes 5 à 1000 sont TeL-Ceb6 infectées avec des m.o.i. croissantes en Ad GALVenv. La Figure 5B représente l'agrandissement des pistes 250 et 500, exposition du film réduite.

Un anticorps dirigé contre la partie N-terminale de l'enveloppe amphotrope (sous-unité SU) a été utilisé puisqu'aucun anticorps dirigé contre le pseudotype GALV n'est disponible. Cette étude n'est pas optimale, car la réaction croisée avec l'antigène de singe est assez faible. C'est pourquoi la protéine n'est pas détectée dans un extrait cellulaire de producteurs stables FLY GALV (figure 5A). Par contre, le Western Blot montre une synthèse forte et croissante de la protéine d'enveloppe dans les cellules infectées par l'adénovirus Ad GALVenv. Malgré son intensité inattendue, le signal observé est spécifique de la gp70. Il n'est pas dû à une réaction croisée de l'anticorps avec une protéine adénovirale apportée par l'infection, puisqu'il n'est pas retrouvé avec des extraits cellulaires de TeLCeb6 infectées par un adénovirus contrôle CMV-LacZ. Les deux bandes rapprochées observées par Western Blot pourraient correspondre

au peptide précurseur Pr85 et à la forme mature gp70 (figure 5B). Ceci plaide en faveur d'un adressage correct de l'enveloppe à la surface de membranes plasmique, puisque le clivage SU/TM sensé libérer le domaine de fusion est nécessaire à la translocation du polypeptide (Zhu N.L. et al, J. Virol. 1998, 72:1632-1639).

L'analyse de la production rétrovirale montre une saturation du système TeLCeb6. Le titre maximal en particules LacZ infectieuses est obtenu pour les faibles m.o.i. en Ad GALVenv (tableau 2 ci-dessous).

Tableau 2 : Production de particules rétrovirales avec l'adénovirus Ad GALVenv

m.o.i. en Adénovirus Ad GALVenv	Titre en IU/ml (deux jours post-infection)
ADN	4,0 10^4
10	4,7 10^6
25	5,0 10^6
50	3,4 10^6
100	1,0 10^6
250	9,0 10^5
Plasmide	4 10^4
TG18	4,6 10^6

Alors que la transfection des cellules TeLCeb6 avec un plasmide codant pour l'enveloppe de GALV donne des surnageants titrant à 4×10^4 IU/ml, des titres de 4 à 5×10^6 IU/ml ont été obtenus deux jours après l'infection adénovirale avec des m.o.i. entre 10 et 50. Un tel système transitoire permet d'obtenir une production rétrovirale équivalente à la lignée stable productrice TG18.

Pour des m.o.i. supérieures, les titres décroissent en proportion d'un effet cytopathique, qui peut être sans doute corrélé à

l'expression de protéine adénovirale précoce et tardive détectée par immunocytochimie.

Là encore, aucun rétrovirus compétent pour la réplication n'a pu être détecté par les tests LacZ.

5

Exemple 3

Production de particules rétrovirales par co-infection avec les adénovirus gag-pol et env

Les conditions optimales de production ont été déterminées en infectant les cellules TeLacZ trans-complémentantes, dérivant de Te671 et exprimant de façon stable le vecteur rétroviral (COSSET, F.L., et al., 1995, 69, 7430-7436). Deux jours après l'infection des cellules TeLacZ, des titres supérieurs à 10^5 IU/ml ont été obtenus quand les deux m.o.i. se situent entre 50 et 100. Bien qu'il n'y ait pas de corrélation évidente entre la production de rétrovirus et les rapports entre les deux adénovirus Aggag-pol; et Ad env, l'analyse de la production de rétrovirus au cours du temps a été réalisée avec des m.o.i. égales pour les deux virus.

15

Le tableau 3 ci-dessous indique la production de rétrovirus en fonction de la multiplicité d'infection des deux adénovirus Adgag-pol et Ad env.

20

Tableau 3 : rétrovirus les 2ème, 3ème et 4ème jours après l'infection adénovirale

m.o.i. AdGALVenv et Adag-pol	Titres rétroviraux (IU/ml) les jours suivants l'infection adénovirale		
	2	3	4
5/5	$4,8 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$1,6 \times 10^4$
10/10	$9,6 \times 10^5$	$7,9 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$
50/50	$3,2 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$6,4 \times 10^5$
100/100	$1,3 \times 10^6$	$9,5 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$

TG18	$2,2 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$
------	-------------------	-------------------	-------------------

Les titres rétroviraux diminuent au cours du temps, et ceci indépendamment des m.o.i. des adénoviraux et en l'absence des faits cytopathiques. Néanmoins, l'infection de cellules productrices avec des m.o.i. de 50 conduit à des titres de 2×10^6 IU/ml pendant deux jours.

Aucun rétrovirus compétent pour la réplication n'a pu être détecté dans les surnageants de cultures cellulaires récoltées deux et trois jours après l'infection.

Exemple 4

Caractérisation fonctionnelle de l'adénovirus Ad-MCD2

1. Obtention des adénovirus recombinants Ad VL30mCD2 et Ad MFG-mCD2 représentés dans la Figure 3

Un vecteur rétroviral MFG codant pour l'antigène de surface CD2 murin a été décrit (Champsex et al, 1996 ...). Le vecteur a donc été inséré dans le génome adénoviral délété de la région E1, et des stocks de virus Ad MFG-mCD2 a été amplifié, titrant à 2×10^{10} pfu/ml.

2. Production de particules rétrovirales avec Ad MFG-mCD2

Les Te-FLYA ont été infectées avec des m.o.i. croissantes en Ad MFG-mCD2 purifié. Dès la m.o.i. de 5, la population est globale mCD2 positive (Figure 6A) contrairement à ce qu'indique les clones producteurs contrôle (Figure 6B). Elle devient plus homogène avec des charges plus élevées en adénovirus, mais les cellules présentent un effet cytopathique précoce pour des m.o.i. supérieures à 50.

L'analyse des cibles montre une transduction de 3 à 9 % des cellules, (Tableau 4 ci-dessous). Le contrôle des FLYA transfectées avec le plasmide portant le vecteur ne donne pas de transduction décelable.

Tableau 4 : Production rétrovirale par les Te-FLYA infectées avec l'Ad MFG-mCD2

m.o.i. en Adénovirus Ad MFG-mCD2	% de Cellules Cibles mCD2+	Effet cytopathique (deux jours post-infection)
DNA	0.03	--
5	3.5	--
10	5.4	--
25	7.3	--
50	8.1	+
100	9.7	++
250	N.D.	+++

De façon surprenante, alors que les clones producteurs infectés à des m.o.i. jusqu'à 50 expriment des niveaux élevés de mCD2, les cellules transduites n'excèdent pas 10 % de la population totale. Cependant, une augmentation de la multiplicité d'infection des adénovirus conduit à une transduction plus efficace allant jusqu'à 24 % des cellules positives. En revanche, aucun transfert de gènes mCD2 n'a pu être détecté avec les cellules productrices TeFLY-GALV transfectées.

Exemple 5

Production de particules rétrovirales avec Ad gag-pol, Ad GALVenv et Ad mCD2

Les Te671 ont été infectées avec les trois adénovirus simultanément, avec des m.o.i. de 10 ou 50 pour les fonctions de packaging, et des m.o.i. de 10, 25 et 50 pour le vecteur. On retrouve des niveaux de transduction de 8-10 % comparables à ceux obtenus sur les

producteurs stables Te-FLYGALV (Tableau 5, les deux dernières lignes) ou Te-FLYA (Tableau 4) infectés avec l'adénovirus Ad MFGmCD2 seul.

Tableau 5 : Production rétrovirale par le Te671 infectées les trois adénovirus

m.o.i. en Ad gag-pol et Ad GALVenv	m.o.i. en Ad MFG-mCD2	% de Cellules cibles mCD2+
10/10	10	8
10/10	50	4,4
25/25	10	8,7
25/25	50	8,9
50/50	10	8,2
50/50	50	10,6
--	10	3,5
--	50	9,4

L'analyse en cytométrie de flux des Te671 cibles maintenues en culture dix jours après l'infection rétrovirale montre une expression constante de mCD2 (données non présentées). La population cellulaire garde 10-11 % de cibles exprimant le transgène. Ce résultat indique que le transfert du gène est stable, et n'est pas le fait d'une contamination des surnageants rétroviraux par les adénovirus Ad MFGmCD2.

Exemple 6

Screening des lignées cellulaires combinant la permissivité à l'infection adénovirale et des hauts titres de production rétrovirale

La production rétrovirale in vitro a été analysée par l'infection simultanée des cellules avec les trois adénovirus recombinants. Afin de comparer cette production à celle obtenue avec les cellules TeFLY-GALV.

infectées par AdmCD2, dans le même contexte cellulaire, les cellules Te671 ont d'abord été infectées avec des m.o.i. croissantes de Adgag-pol, AdGALV env et AdmCD2. Deux jours après l'infection, les cellules cibles sont incubées avec les surnageants de cultures infectieux, en présence d'anticorps bloquant les adénovirus. Là encore, bien que les cellules productrices exprimant l'antigène CD2, quelle que soit la multiplicité d'infection adénovirale, ont été utilisées, la transduction apparaît être dépendante de la multiplicité d'infection. La fraction des cellules cibles positives exprimant le marqueur se situe entre 1,5 et 24,3 % de la population totale (Figure 7A). Les cellules infectées par le surnageant sont maintenues en culture pendant trois semaines de plus et analysées quant à l'expression de l'antigène mCD2 à long terme. Des populations cellulaires positives sont toujours détectées, confirmant que l'induction de mCD2 résulte de la transduction rétrovirale et non de la transduction adénovirale (Figure 7B).

Il faut souligner que les niveaux de mobilisation de mCD2 sont comparables à ceux obtenus après l'infection des cellules TeFLY-GALV avec AdmCD2 seul. Il a été précédemment observé que l'augmentation, tant des fonctions gag-pol que env ou de l'expression du vecteur, n'augmente pas les titres rétroviraux, comparé à ce qui se passe dans les lignées productrices stables. Dans le procédé mis en oeuvre ici, la surexpression des fonctions d'empaquetage et du vecteur rétroviral n'est pas suffisante pour surmonter le phénomène de saturation. Si la cause d'une telle limite reste non déterminée, la flexibilité de notre système de production transitoire nous a permis de sélectionner différentes lignées cellulaires avec les conditions expérimentales décrites ci-dessus.

Les lignées cellulaires humaines ont été testées préférentiellement, car les particules produites à partir de telles lignées présentent une sensibilité réduite au complément du sérum. Des lignées A549 infectées par l'adénovirus sont des mauvais candidats, car elles

présentent une production faible avec environ 3 % des cellules cibles transduites (Figure 7B).

En revanche, les cellules HeLa et surtout les cellules d'hépatocarcinomes HuH7 apparaissent être de bons ou même
5 d'excellents producteurs, dans la mesure où 37,6 % et 61,9 % de cellules positives pour mCD2 ont été détectées respectivement dans ces deux lignées après incubation avec les surnageants infectieux.

Tant pour les cellules HeLa que pour les cellules HuH7, les populations transduites restent stables après 21 jours de culture in vitro,
10 confirmant que le transfert de gènes mCD2 n'a eu lieu que par le biais de la transduction rétrovirale. Les hauts titres de production de rétrovirus ne semblent pas être reliés à une quelconque permissivité cellulaire particulière à l'infection adénovirale, puisque les essais de production utilisant les cellules Vero hautement productives ne permettent pas
15 d'obtenir une transduction améliorée du rétrovirus. Au contraire, moins de 8 % de cellules positives ont été détectées avec les cellules Vero.

REVENDEICATIONS

1. Procédé pour l'établissement d'une lignée cellulaire apte à produire des particules rétrovirales, à un titre supérieur à 10^6 UI/ml et comprenant les étapes de :

(a) sélection d'une lignée cellulaire eucaryote susceptible à l'infection virale,

(b) transfection par un vecteur rétroviral porteur d'un transgène sous le contrôle de séquences régulatrices rétrovirales et porteur de la séquence d'encapsidation, et dépourvue des gènes de structure du rétrovirus, ou infection par une particule rétrovirale dont le génome est porteur des séquences équivalentes,

(c) infection de ladite lignée par au moins un virus recombinant dépourvu de séquence d'encapsidation et porteur de séquences rétrovirales gag-pol et env, gag-pol et env étant de préférence issues de rétrovirus différents, ou transfection par au moins un vecteur adénoviral porteur des mêmes séquences

(d) criblage des lignées productrices au titre recherché,
- soit sur la base du titre rétroviral obtenu dans le surnageant cellulaire,
- soit sur la base de l'absence de virus helper dans le surnageant.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la lignée cellulaire est d'origine hépatique ou embryonnaire.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le transgène est un gène rapporteur.

4. Procédé selon l'une des revendications précédentes dans lesquelles gag-pol est issu d'un lentivirus et env est issu de la protéine G de VSV-G sous le contrôle du promoteur CMV, ou d'un promoteur inductible. Il peut être issu enfin de l'enveloppe des rétrovirus amphotrope "10 A1".

5. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que dans l'étape (c) gag-pol et env sont portés par deux vecteurs différents ou deux constructions virales différentes.

6. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le ou les vecteurs viraux ou les virus sont d'origine adénovirale ou baculovirale.

7. Procédé de production de rétrovirus recombinants porteurs de gènes d'intérêt à un titre égal ou supérieur à 10^6 UI/ml, comprenant :

- (a) sélection d'une lignée cellulaire eucaryote susceptible à l'infection virale,
- (b) transfection par un vecteur porteur d'un gène d'intérêt sous le contrôle de séquences régulatrices rétrovirales et porteur de la séquence d'encapsidation, et dépourvue des gènes de structure du rétrovirus, ou infection par une particule rétrovirale dont le génome est porteur des mêmes séquences que ledit vecteur,
- (c) infection de ladite lignée par au moins un virus recombinant dépourvu de séquence psi et porteur de séquences rétrovirales gag-pol et env, gag-pol et env étant de préférence issues de rétrovirus différents, ou transfection par au moins un vecteur adénoviral porteur des mêmes séquences,

(d) la culture de ces cellules dans un milieu approprié à la récolte des particules rétrovirales porteuses du transgène.

5 8. Procédé selon la revendication 7 dans laquelle gag-pol est issu d'un lentivirus et env est issu de la protéine G de VSV-G sous le contrôle du promoteur CMV, ou d'un promoteur inductible. Il peut être issu enfin de l'enveloppe des rétrovirus amphotrope "10 A1".

10 9. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les étapes (b) et (c) sont successives.

10. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les étapes (b) et (c) sont simultanées.

15 11. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le vecteur en (b) est un vecteur adénoviral ou baculoviral.

20 12. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le vecteur en (b) est un vecteur rétroviral.

13. Procédé selon l'une des revendications 7 à 12, caractérisé en ce que le vecteur non rétroviral en (c) est un vecteur adénoviral.

25 14. Procédé selon l'une des revendications 7 à 12, caractérisé en ce que le vecteur non rétroviral en (c) est un baculovirus.

30 15. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les séquences rétrovirales gag-pol et env sont portées par deux vecteurs distincts.

16. Procédé selon l'une des revendications 7 à 15, caractérisé en ce que gag-pol est issu du MoMLV et est sous le contrôle du promoteur du CMV.

5

17. Procédé selon l'une des revendications 7 à 16, caractérisé en ce que env est issu du GaLV et est sous le contrôle du promoteur EF1.

10

18. Procédé selon l'une des revendications 7 à 16, caractérisé en ce que le transgène est sous le contrôle d'un LTR rétroviral.

15

19. Procédé selon l'une des revendications 7 à 16, caractérisé en ce que le transgène est sous le contrôle d'un promoteur interne.

20. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les cellules eucaryotes sont des cellules hépatiques.

20

21. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les cellules eucaryotes sont des cellules embryonnaires.

22. Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que les cellules sont des cellules HuH7.

25

23. Lignée cellulaire hépatique HuH7 dans laquelle ont été transférées par transfection ou infection des fonctions rétrovirales d'encapsidation, des fonctions rétrovirales de régulation, et des sites de restriction permettant l'insertion d'un transgène.

30

24. Trousse pour la production de particules rétrovirales porteuses d'un transgène comprenant au moins :

(a) un récipient contenant un virus non rétroviral ou un plasmide porteur d'un gène gag-pol,

5 (b) un ou plusieurs récipients contenant un virus non rétroviral ou un plasmide viral porteur d'un gène env,

(c) un ou plusieurs récipients contenant un plasmide porteur d'un vecteur rétroviral, ou un rétrovirus défectif ou contenant un virus non rétroviral contenant au moins la séquence d'encapsidation, les
10 séquences régulatrices, et des sites multiples de restriction permettant l'insertion d'un transgène,

(d) le cas échéant, un récipient contenant un plasmide contrôle porteur d'un vecteur rétroviral, contenant au moins un gène rapporteur.

15

25. Trousse selon la revendication 24, caractérisée en ce que les virus ou plasmides en (a), (b), (c) et (d) sont sous forme congelée.

26. Trousse selon la revendication 24 ou 25, caractérisée en ce que en (a), gag-pol est issu du MoMLV et est sous le contrôle du promoteur du CMV.
20

27. Trousse selon l'une des revendications 24 à 26, caractérisée en ce que en (b), env est issu du GaLV et est sous le contrôle du promoteur EF1.
25

28. Trousse selon l'une des revendications 24 à 27, caractérisée en ce que en (c), LTR et la séquence psi issues de rétrovirus murins.

30

29. Trousse selon l'une des revendications 24 à 28, caractérisée en ce que en (c), le plasmide portant le vecteur rétroviral contient en outre un marqueur de sélection.

5 30. Trousse selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le virus en a) ou en b) est un adénovirus.

31. Trousse selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le virus en a) ou en b) est un baculovirus.

10

32. Trousse pour l'établissement d'une lignée productrice de particules rétrovirales à un titre égal ou supérieur à 10^6 UI/ml, comprenant au moins :

15 (a) un récipient contenant un virus non rétroviral ou un plasmide porteur d'un gène gag-pol,

(b) un ou plusieurs récipients contenant un virus non rétroviral ou un plasmide porteur d'un gène env,

20 (c) un ou plusieurs récipients contenant un plasmide porteur d'un vecteur rétroviral, ou un rétrovirus défectif ou un virus non rétroviral contenant au moins la séquence d'encapsidation, les séquences régulatrices, et un gène reporteur.

33. Trousse selon la revendication 32, caractérisée en ce que le virus est un adénovirus ou un baculovirus.

25

34. Trousse selon la revendication 32, caractérisée en ce que les virus ou plasmides en (a), (b), (c) sont sous forme congelée.

35. Trousse selon l'une des revendications 32 à 34, caractérisée en ce que en (a), gag-pol est issu du MoMLV et est sous le contrôle du promoteur du CMV.

5 36. Trousse selon l'une des revendications 32 à 35, caractérisée en ce que en (b), env est issu du GaLV et est sous le contrôle du promoteur EF1.

10 37. Trousse selon l'une des revendications 32 à 34, caractérisée en ce que en (a), gag-pol est issu d'un lentivirus.

15 38. Trousse selon l'une des revendications 32 à 35, caractérisée en ce que en (b), env est issu de la protéine G du virus de la stomatite vésiculeuse sous le contrôle du promoteur CMV, ou d'un promoteur inductible. Il peut être issu enfin de l'enveloppe des rétrovirus amphotrope "10 A1".

20 39. Trousse selon l'une des revendications 32 à 35, caractérisée en ce que en (c), le plasmide portant le vecteur rétroviral contient en outre un marqueur de sélection.

1/5

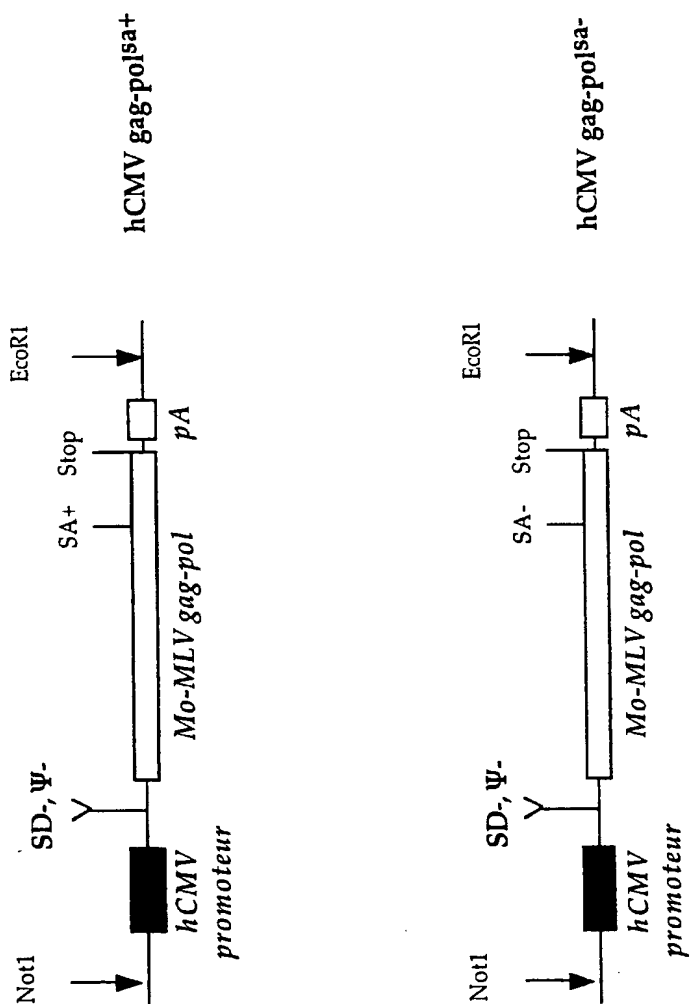


FIGURE 1

2/5

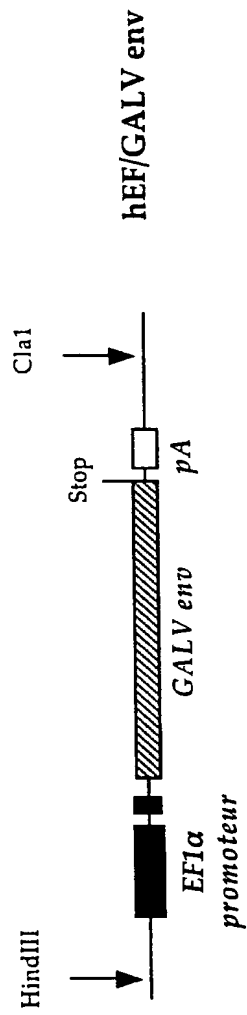


FIGURE 2

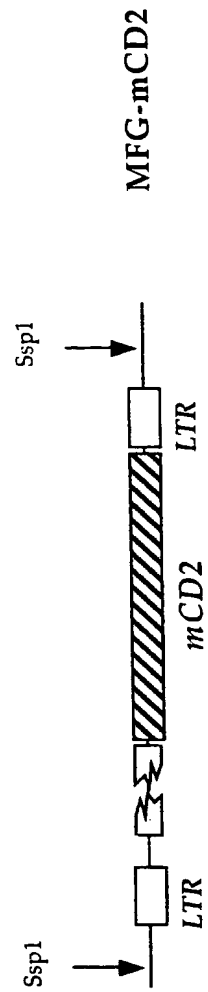
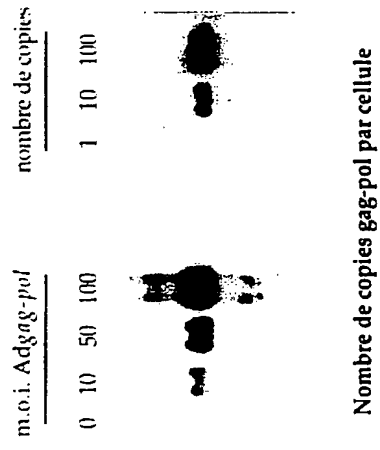


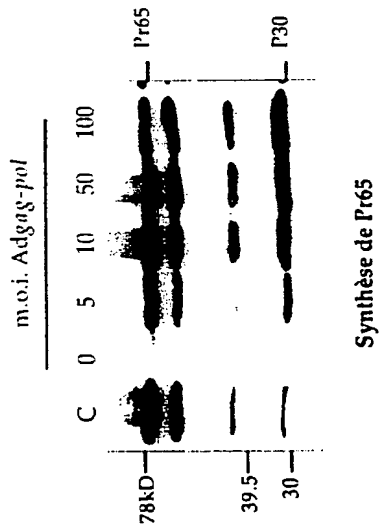
FIGURE 3

3/5

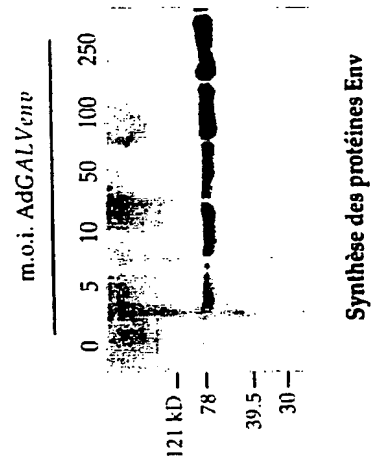


Nombre de copies gag-pol par cellule

FIGURE 4



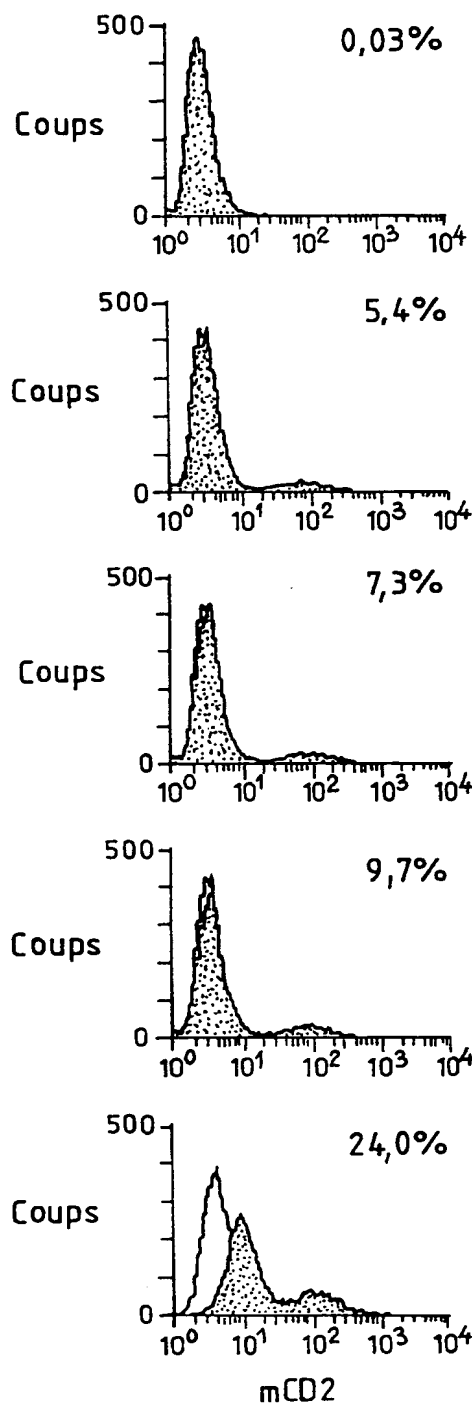
Synthèse de Pr65



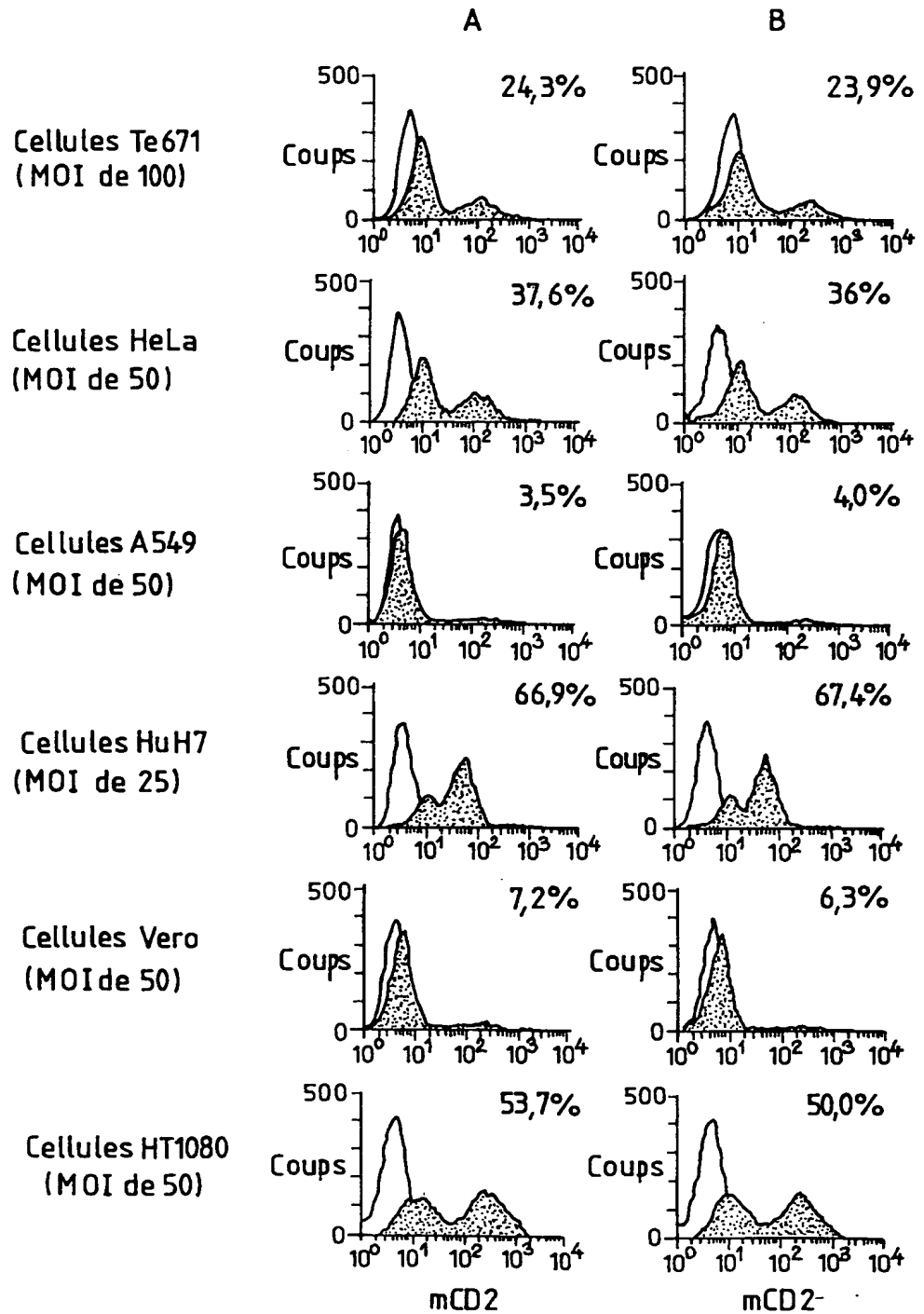
Synthèse des protéines Env

FIGURE 5

4/5

FIG_6

5/5

FIG_7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 99/01353

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N5/10 C12N15/86

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PATIENCE C ET AL: "Packaging of endogenous retroviral sequences in retroviral vectors produced by murine and human packaging cells." JOURNAL OF VIROLOGY, (1998 APR) 72 (4) 2671-6, XP002097709 the whole document	1-39
A	KIM S H ET AL: "Construction of retroviral vectors with improved safety, gene expression, and versatility." JOURNAL OF VIROLOGY, (1998 FEB) 72 (2) 994-1004, XP002097710 the whole document	1-39
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 November 1999

Date of mailing of the international search report

30/11/1999

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 6818 Patentzen 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/FR 99/01353

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SAVARD N ET AL: "Defective herpes simplex virus type 1 vectors harboring gag, pol, and env genes can be used to rescue defective retrovirus vectors." JOURNAL OF VIROLOGY, (1997 MAY) 71 (5) 4111-7, XP002097711 the whole document	1-39
A	SALVETTI A ET AL: "Factors influencing recombinant adeno-associated virus production." HUMAN GENE THERAPY, (1998 MAR 20) 9 (5) 695-706, XP002097712 the whole document	1-39
A	WO 96 30533 A (BAVARIAN NORDIC RESEARCH INSTITUTE) 3 October 1996 (1996-10-03) the whole document	1-39
A	DAVIS J L ET AL: "Retroviral particles produced from a stable human-derived packaging cell line transduce target cells with very high efficiencies." HUMAN GENE THERAPY, (1997 AUG 10) 8 (12) 1459-67, XP002097713 cited in the application the whole document	1-39
A	ROLLINS S A ET AL: "Retroviral vector producer cell killing in human serum is mediated by natural antibody and complement: strategies for evading the humoral immune response." HUMAN GENE THERAPY, (1996 MAR 20) 7 (5) 619-26, XP002097714 cited in the application the whole document	1-39
P,X	DUISIT G ET AL: "Functional characterization of adenoviral/retroviral chimeric vectors and their use for efficient screening of retroviral producer cell lines." HUMAN GENE THERAPY, (1999 JAN 20) 10 (2) 189-200. , XP002122505 the whole document	1-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 99/01353

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9630533 A	03-10-1996	AU 5274696 A EP 0817860 A JP 11502706 T	16-10-1996 14-01-1998 09-03-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Date internationale No
PCT/FR 99/01353

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N5/10 C12N15/86		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	PATIENCE C ET AL: "Packaging of endogenous retroviral sequences in retroviral vectors produced by murine and human packaging cells." JOURNAL OF VIROLOGY, (1998 APR) 72 (4) 2671-6, XP002097709 le document en entier	1-39
A	KIM S H ET AL: "Construction of retroviral vectors with improved safety, gene expression, and versatility." JOURNAL OF VIROLOGY, (1998 FEB) 72 (2) 994-1004, XP002097710 le document en entier	1-39
-/-		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
* Catégories spéciales de documents cités:		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">17 novembre 1999</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">30/11/1999</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 6818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Moreau, J</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche Internationale No
PCT/FR 99/01353

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	SAVARD N ET AL: "Defective herpes simplex virus type 1 vectors harboring gag, pol, and env genes can be used to rescue defective retrovirus vectors." JOURNAL OF VIROLOGY, (1997 MAY) 71 (5) 4111-7, XP002097711 le document en entier	1-39
A	SALVETTI A ET AL: "Factors influencing recombinant adeno-associated virus production." HUMAN GENE THERAPY, (1998 MAR 20) 9 (5) 695-706, XP002097712 le document en entier	1-39
A	WO 96 30533 A (BAVARIAN NORDIC RESEARCH INSTITUTE) 3 octobre 1996 (1996-10-03) le document en entier	1-39
A	DAVIS J L ET AL: "Retroviral particles produced from a stable human-derived packaging cell line transduce target cells with very high efficiencies." HUMAN GENE THERAPY, (1997 AUG 10) 8 (12) 1459-67, XP002097713 cité dans la demande le document en entier	1-39
A	ROLLINS S A ET AL: "Retroviral vector producer cell killing in human serum is mediated by natural antibody and complement: strategies for evading the humoral immune response." HUMAN GENE THERAPY, (1996 MAR 20) 7 (5) 619-26, XP002097714 cité dans la demande le document en entier	1-39
P,X	DUISIT G ET AL: "Functional characterization of adenoviral/retroviral chimeric vectors and their use for efficient screening of retroviral producer cell lines." HUMAN GENE THERAPY, (1999 JAN 20) 10 (2) 189-200. , XP002122505 le document en entier	1-39

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De internationale No

PCT/FR 99/01353

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9630533 A	03-10-1996	AU 5274696 A EP 0817860 A JP 11502706 T	16-10-1996 14-01-1998 09-03-1999

Detailed description of the invention

The invention relates to a method for producing recombinant retroviruses carrying genes of interest, with a titer equal to or greater than 10^6 UI/ml, comprising:

(a) selecting a eukaryotic cell line which can be infected with a virus,

(b) transfecting with a vector carrying a gene of interest under the control of retroviral regulatory sequences, carrying the encapsidation sequence, and lacking the structural genes of the retrovirus, or infecting with a retroviral particle, the genome of which carries the same sequences as said vector,

(c) infecting said line with at least one recombinant virus lacking the psi sequence and providing the retroviral gag-pol and env sequences, gag-pol and env preferably being derived from different retroviruses, or transfecting with at least one adenoviral vector carrying the same sequences,

(d) culturing the cells in a medium suitable for harvesting the retroviral particles carrying the transgene.

In this method, the viral vector(s) or the viruses are preferably of adenoviral or baculoviral origin.

In the present invention, gag-pol may in particular be derived from a lentivirus such as SIV (simian immunodeficiency virus).

The retroviral regulatory sequences and encapsidation sequences of the plasmid or in the virus described in b) are preferably derived from murine retroviruses and from caprine, feline or primate lentiviruses.

The basic principle of the invention is the constitution of adenoviral vectors carrying the sequences encoding retroviral functions. Throughout the text, it is

clearly understood that, each time reference is made to adenovirus or adenoviral vector, this may be taken to mean, similarly, the functional equivalents of these viruses or of these vectors. More particularly, baculovirus or baculoviral vectors may be used in the same way as adenoviruses.

All the retroviral functions, associated with a transgene, are transferred into the target cell, simultaneously or sequentially, using transfection or infection systems for adenoviral vectors or adenoviruses.

The secondary genes of retroviruses, namely tat, rev, vif, vpr and vpt, may be included in or excluded from the chimeric construct. Exclusion adds to the viral safety of the system.

The viral functions of gag-pol and env encapsidation may be carried by a single adenoviral vector.

However, this has the drawback of decreasing the flexibility of the kit. Specifically, if env is carried by a separate vector, it is possible to vary the nature of the retrovirus produced by the cells by varying the origin of the env gene introduced, which is not the case when the different functions are carried by the same vector.

Thus, a preferred embodiment is to have the retroviral elements carried by three distinct viral vectors:

- the first carrying the regulatory sequences including the LTR and the encapsidation sequences Ψ or a functional equivalent, and the transgene introduced in a suitable manner into the restriction sites provided for this purpose;

- a viral vector carrying the gag-pol gene and a viral vector carrying the env gene.

The term "viral vector" is preferably intended to mean an adenoviral vector or a baculoviral vector, the structures and performances of which are well documented. However, any other nonintegrative virus should be considered to be a functional equivalent of such a virus. Those skilled in the art will understand that any virus capable of infecting a target cell with a low multiplicity of infection and capable of expressing the functions carried by its genome in said target cell should be considered to be a functional equivalent of the adenovirus. Thus, in the text below, reference will preferably be made to "adenoviral vector" or "adenovirus".

Throughout the text, and in order to simplify the latter, it is understood that, when reference is made to "adenoviral vector", this should be understood to mean both the vector itself, which can be administered by transfection into the target cell, and the virus containing a genome carrying the same sequences, which can be administered by infection of the target cell.

Similarly, the expression "retroviral vector capable of transfecting the target cell" should be understood to mean both the vector which can be administered by transfection and the viral particle, the genome of which carries the same sequences as the vector in question.

In the above method, steps b) and c) may be simultaneous or successive.

Specifically, if the intention is to have a transient retroviral particle production system, the three vectors can be transferred simultaneously (or the three viruses can infect the cells simultaneously). While the titer obtained is lower than that obtained after stable expression, the advantage is that the answer regarding the choice of target cell is virtually instantaneous.

It is also possible to develop a stable expression system by, in the first instance, transfection or infection with the vector carrying the retroviral vector (step (b)), and then, after about two weeks, after stable integration of said vector into the genome, the target cell can be infected or transfected with the adenoviruses or the adenoviral vectors carrying the structural genes of the retrovirus (step (c)). Steps (b) and (c) of the method are then successive.

In the method of the invention, the gag-pol and env genes are under the control of promoters which can be activated in the target cell. For example, the CMV promoter may be chosen for gag-pol and the EF1 α promoter may be chosen for env. Those skilled in the art may select any promoter known to be efficient in transcribing the sequences which it controls.

As regards the transgene, it will be under the control of retroviral regulatory sequences containing the LTRs, or under the control of an internal promoter of the PGK (phosphoglycerate kinase) type.

The invention also relates to a method for establishing a eukaryotic cell line capable of producing retroviral particles at a titer greater than 10^6 UI per ml, and comprising the steps of:

- (a) selecting a eukaryotic cell line which can be infected with a virus;
- (b) transfecting with a retroviral vector carrying a transgene under the control of retroviral regulatory sequences, carrying the encapsidation sequence, and lacking the structural genes of the retrovirus, or infecting with a retroviral particle, the genome of which carries the equivalent sequences;

(c) infecting said line with at least one recombinant virus lacking the encapsidation sequence and carrying gag-pol and env retroviral sequences, gag-pol and env preferably being derived from different retroviruses, or transfecting with at least one adenoviral vector carrying the same sequences;

(d) screening for producer lines which give the desired titer, on the basis of the retrovirus titer obtained in the cellular supernatant.

In this case, the transgene present in the retroviral vector will preferably be a reporter gene for rapidly selecting and measuring the cell lines producing retroviruses at the desired titer.

As with the production method described above, steps b) and c) may be simultaneous or successive depending on whether the method uses transient expression or stable expression of the retroviral vector in the target cells. For the screening for producer lines, transient expression will be sought.

Similarly, in order to avoid any homologous recombination, the sequences carried by, firstly, the gag-pol adenoviruses and, secondly, the env adenoviruses are carried by two distinct adenoviruses and are preferably of different retroviral origin. In order to implement the method of the invention, there was a prior step of constitution and functional characterization of, firstly, the adenoviruses carrying gag-pol and, secondly, the adenoviruses carrying env. The methodology for obtaining these viruses or these adenoviral vectors is set out below in the examples. Recombinant adenoviruses which are particularly advantageous according to the invention are those in which gag-pol is derived from MoMLV and env is derived from the GaLV (Gibbon Ape leukemia virus)

retrovirus. The env gene of the feline RD114 virus is also a good candidate for obtaining high-titer viral reconstitution without generating "helper" virus.

An adenovirus or adenoviral vector carrying retroviral sequences is called adeno-retrovirus or adenoretroviral vector.

The recombinant adeno-retroviruses which can be used in the methods of the invention will always be selected by:

- the titering of the retroviral supernatants obtained after infection of the producer cells, and optimization thereof as a function of the multiplicity of adenoviral infections;

- the absence of "helper" retrovirus in the production supernatant.

Any combination of gag-pol and env on one or two adenoviral vectors, whatever the origin of the retroviral genes, whether or not an SV 40 origin of replication or a polyadenylation site or any other site conventionally used to improve the performances of the vectors or of the recombinant viruses is present will always be screened with a view to the above two parameters: titer and/or absence of helper retrovirus.

In the methods of the invention, all cells which can be infected with a virus or which can be transfected may be good candidates for using the production or screening method. However, there is great variability in the production capacities of cells, without it being possible to determine the cause of this variability. HeLA cells (ATCC No. CCL-2), and especially hepatic cells, an example of which is given by the HuH7 hepatocarcinoma lines (NAKABAYASHI, H. et al., 1982, Cancer Research 42, 3858-3863), appear to be particularly efficient producers;

mention may also be made of the Ht 1080 line CRL-8805; on the other hand, very poor gene transfer was detected using A549 cells (ATCC No. CCL-185.1).

The invention also relates to the hepatic cell lines transfected or transformed with a retroviral vector carrying the encapsidation functions and lacking the retroviral structural genes. Said vector may carry a transgene, the expression of which is desired in a target cell, the transgene being either a gene of interest for gene therapy or a reporter gene for studies or optimization of a method.

In choosing the target cells, certain hepatic lines appear to be of particularly high performance. These are the HuH7 and Ht 1080 lines mentioned above or the Hep 3B or HEP G2 lines, into which the recombinant vectors have been transferred.

More generally, embryonic lines are good candidates in the methods and kits according to the invention.

The use of the HuH7 line in the two methods described above is also part of the invention.

The invention also relates to a kit for producing retroviral particles carrying a transgene, and comprising at least:

- (a) one receptacle containing an adenovirus or an adenoviral plasmid carrying a gag-pol gene;
- (b) one or more receptacles containing an adenovirus or an adenoviral plasmid carrying an env gene;
- (c) one or more receptacles containing a plasmid carrying a retroviral vector, or containing a defective retrovirus or a nonretroviral virus containing at least the encapsidation sequence, the regulatory sequences and multiple restriction sites for insertion of a transgene;

(d) where appropriate, a receptacle containing a control plasmid carrying a retroviral vector containing at least one reporter gene.

In the kit according to the invention, the viruses or the plasmids in a), b), c) or d) above are preferably in frozen form, but may also be in lyophilized form.

Since the kit is intended for carrying out the method described above, the various construction possibilities described above are, of course, the preferred modes for the plasmids or the viruses present in the kit of the invention, namely that, firstly, gag-pol and, secondly, env are derived from different retroviruses. For example, gag-pol is derived from MoMLV and under the control of the cytomegalovirus promoter, whereas env is derived from GaLV and is under the control of the EFl α promoter. The retroviral regulatory sequences and the encapsidation sequences of the plasmid or in the virus described in c) are preferably derived from murine retroviruses and from caprine, feline or primate lentiviruses.

Finally, the plasmid in c) carrying the retroviral vector preferably contains a selectable marker.

A similar kit for establishing a retroviral particle-producing line is also part of the invention.

It comprises at least:

(a) one receptacle containing an adenovirus or an adenoviral plasmid carrying a gag-pol gene;

(b) one or more receptacles containing an adenovirus or an adenoviral plasmid carrying an env gene;

(c) one or more receptacles containing a plasmid carrying a retroviral vector, or containing a defective retrovirus or a nonretroviral virus containing at least the encapsidation sequence, the regulatory sequences and a reporter gene.

The flexibility of use of the kits according to the invention results, inter alia, from the choice of the producer cells. All cells which can be transfected with plasmids or infected with viruses, and particularly with adenoviruses and with baculoviruses, may be used.

Several versions of the kit may be available, depending on the choice of retroviral envelope made by the user.

It may be an amphotropic kit when the env adenovirus corresponds to an amphotropic envelope. It may also be a GaLV kit when the env adenovirus encodes the Gibbon retrovirus envelope. The same is true for the RD 114, ECO and XENO envelopes and also the adenovirus encoding the VSV-G envelope.

Several types of packaging may be provided, depending on the amount of supernatants desired:

- a "mini" kit comprising 1 to 5×10^9 pfu for each adenovirus and allowing the production of 50 ml of infectious supernatants;
- a "maxi" kit containing 1 to 5×10^{10} pfu for each adenovirus and allowing the production of 500 ml of infectious supernatants;
- a "mega" kit containing 5 to 10×10^{11} pfu for each adenovirus and allowing the production of 2 l of infectious supernatants.

Use of the kits according to the invention may occur in several manners:

1) It may make it possible to create a population of cells stably expressing the retroviral vector carrying the transgene. The plasmid is then preferably transfected with a selectable marker of neomycin or blasticidin type. After culturing for two weeks in the presence of the drug,

the population is formed. If the transgene encodes a protein which can be visualized by flux cytometry, it may be sorted earlier.

After this, the line stably expressing the retroviral vector will be infected with, firstly, the gag-pol and, secondly, env encapsidation adenoviruses contained in the receptacles in a) and b) above. The next day, the culture medium is changed. It is collected, filtered and ready to be used the following day and every day for four days.

2) The retroviral vector is transfected into the chosen cells at the time of coinfection with the encapsidation adenoviruses. The culture medium is changed the following day and the supernatant is collected 24 hours later. The target cells, which then exhibit transient expression, nevertheless allow the production capacities of these cells to be determined very rapidly.

The methods and the kits of the invention are advantageously used in the following cases:

(a) production of vectors in a limited amount of time and at low cost: the flexibility of the kit and the rapidity with which the results are obtained make it a tool of choice for scientists seeking to produce recombinant retroviruses;

(b) application to ex vivo gene transfer, for example, into hematopoietic cells. Peripheral blood hematopoietic stem cells are considered to be important targets for gene therapy approaches linked to the treatment of hematological disorders, including hereditary diseases. In particular, this approach is widely used for treating tumors or cancers by gene therapy, after mobilization of the system with GCSF. Application of the kit according to the invention to gene transfer into hematopoietic stem cells of the CD34+ type may make it

possible to combine the advantages of two coculturing systems:

- that of CD34+ stem cells on a layer of stromal cells recreating a cytokine-producing medullary microenvironment (Nolta, Chi.A. et al, Blood 86: 101-110, 1995);

- coculturing hematopoietic stem cells with retrovirus-producing cells produced according to the method of the invention and promoting transduction by direct cell-cell contact (Germeraad W.T., et al, Blood, 84: 780-788, 1994).

In practice, a primary human stroma will be cultured in vitro, in such a way that it maintains its ability to support hematopoiesis. It will then be infected with the adenoviruses carrying the encapsidation functions and the vector, so as to make it a producer of infectious retroviral particles. CD34+ cells will then be transduced by coculturing stem cells on the genetically modified stromal layer, in the absence of exogenous cytokines.

The materials and methods, protocols and examples below may, without being limited, show the effectiveness of the methods of the invention and of the kits in selecting cells which are strong producers of recombinant retroviruses.



PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 5/10, 15/86	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/02529 (43) Date de publication internationale: 22 janvier 1998 (22.01.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01250 (22) Date de dépôt international: 9 juillet 1997 (09.07.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/08889 16 juillet 1996 (16.07.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI) [FR/FR]; 4, place Jussieu, F-75252 Paris Cedex 05 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): KLATZMANN, David [FR/FR]; 11, rue du Tâge, F-75013 Paris (FR). SALZ- MANN, Jean-Loup [FR/FR]; 70, rue Claude Bernard, F- 75005 Paris (FR). (74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann - Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau Lagarde, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des</i> <i>revendications, sera republiée si de telles modifications sont</i> <i>reçues.</i>
(54) Title: HIGHLY PRODUCTIVE PACKAGING LINES		
(54) Titre: LIGNEES D'ENCAPSIDATION HAUTEMENT PRODUCTRICES		
(57) Abstract		
<p>The invention concerns a packaging eukaryotic cell for the production of defective infectious viruses carrying a transgene, characterised in that it is deficient in one cell function essential to its growth, in particular in the presence of a selection culture medium, the said function being capable of being restored by the expression of an exogenous sequence introduced in the cell: either with a vector carrying transcomplementing functions of packaging cells; or with a vector carrying a transgene, and enabling the selection in a selective medium of cells carrying the said exogenous sequence.</p>		
(57) Abrégé		
<p>L'invention concerne une cellule eucaryote d'emballage pour la production de virus infectieux défectifs porteurs d'un transgène, caractérisée en ce qu'elle est déficiente en une fonction cellulaire essentielle à sa croissance, notamment en présence d'un milieu de culture de sélection, ladite fonction étant susceptible d'être restaurée par l'expression d'une séquence exogène introduite dans la cellule: soit avec un vecteur porteur de fonctions transcomplémentantes des cellules d'emballage; soit avec un vecteur porteur du transgène, et permettant la sélection en milieu sélectif des cellules porteuses de ladite séquence exogène.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brsil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LJ	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

LIGNEES D'ENCAPSIDATION HAUTEMENT PRODUCTRICES

L'invention a pour objet de nouvelles lignées cellulaires dites lignées d'encapsidation (lignées de packaging) productrices de rétrovirus recombinants à haut titre et utilisables chez l'homme en thérapie génique.

Le transfert de gènes par rétrovirus recombinants est actuellement largement utilisé aussi bien pour des travaux expérimentaux que dans le cadre d'essais thérapeutiques.

Les vecteurs rétroviraux utilisés dans ces différentes situations sont habituellement produits par des lignées dites « de packaging » ou d'emballage ou de transcomplémentation, ces trois termes ayant la même signification ; ces lignées sont des cellules ayant été transduites avec des constructions génétiques permettant l'expression constitutive des différentes protéines nécessaires à la fabrication d'une particule rétrovirale contenant les protéines de structures et les enzymes nécessaires à leur infectiosité. L'objet de lignée d'encapsidation est de fournir par transcomplémentation des fonctions « helper », en particulier les gènes codant pour les protéines gag, pol et env, qui ont été enlevées du vecteur génomique porteur d'un transgène dont on recherche l'expression par utilisation d'un virus infectieux défectif. Ces fonctions « helper », dépourvues de la séquence ψ , sont exprimées de façon stable dans les cellules de transcomplémentation après transfection d'un ou plusieurs plasmides les contenant et dont les transcrits RNA ne sont pas encapsidés dans les particules virales suite à la délétion de la séquence d'encapsidation Ψ . Quand ces cellules d'encapsidation sont ensuite transfectées par des vecteurs porteurs du transgène, les protéines virales gag produites par la cellule de packaging peuvent encapsider le vecteur rétroviral porteur du transgène dans des particules virales qui sont ensuite relarguées dans l'environnement. (pour une revue voir Miller AD Gene Ther. 1990 1 : 5-14).

Sur ce principe général, différents types de lignées de packaging ont été réalisés et sont largement utilisés aujourd'hui. Cependant, ces lignées sont loin d'être optimisées, notamment en fonction de leur utilisation pour un transgène spécifique ou des modalités particulières. En particulier, il n'existe aucun moyen de faire disparaître les cellules transduites administrées aux patients si le transgène ou son produit d'expression induit des effets indésirables (par une expression inadéquate ou une insertion inappropriée). Un autre aspect pour lequel il est important de disposer de cellules d'emballage susceptibles d'être détruites en cas de besoin sont des problèmes strictement de sécurité, sachant que des recombinaisons pourraient conduire à la formation de virus infectieux à partir des lignées d'emballage.

Le choix des cellules de départ dans lesquelles peuvent être réalisées des lignées de packaging est extrêmement important au regard des propriétés attendues et de leur utilisation clinique potentielle. A ce jour, la plupart des lignées cellulaires utilisées en clinique sont toutes dérivées de fibroblastes d'origine murine, les cellules NIH-3T3. L'intérêt de ces cellules est qu'elles sont parfaitement caractérisées, qu'elles ne sont pas transformées (elles ne donnent pas de tumeur lorsqu'elles sont réinjectées in vivo), qu'elles proviennent d'animaux élevés depuis de nombreuses générations et dont on sait qu'ils ne présentent pas de pathologies particulières (de type neurodégénératif par exemple) qui permettraient de suspecter la présence d'un agent infectieux transmissible chez ces animaux, et donc potentiellement dans les cellules utilisées. De plus, l'utilisation de cellules murines offre un degré de sécurité supplémentaire en cas de contamination par un agent infectieux transmissible inconnu du fait de la restriction d'espèces fréquemment observée en pathologie infectieuse. Cependant, l'un des défauts dont souffrent les cellules murines est dû au fait que les virus produits par ces cellules, et les cellules elles-mêmes sont la plupart du temps rapidement neutralisées par le complément humain. Un moyen simple de palier ce

défaut est de produire des cellules de packaging à partir de cellules humaines ou d'une autre espèce mais résistante au complément humain

Cependant, dans le cas des cellules humaines, elles sont souvent transformées et ont donc un potentiel tumoral. De plus, on ne connaît évidemment pas de façon détaillée l'origine des cellules et leur contamination possible par des agents infectieux d'origine inconnue et capables d'infecter l'homme.

Les cellules simiennes pourraient être utilisées comme les cellules humaines pour leur propriété de faire des particules virales qui ne seraient pas détruites par le complément, mais elles ont, de fait, les mêmes défauts que les cellules humaines concernant la possible présence d'agents infectieux.

Ce peut être des cellules murines dans lesquelles ont été transférés des gènes leur conférant une plus grande résistance au complément et/ou au sérum humain.

Ces gènes peuvent être notamment le CD46, le CD55, le C₁ inhibiteur (C₁INH), la protéine H, le CR₁ soluble et notamment une forme multimérique telle que celle décrite dans le brevet FR 9508901.

L'objet de la présente invention est de fournir des moyens pour la préparation de nouvelles lignées d'encapsulation remédiant au moins en partie à un ou plusieurs des problèmes précédemment décrits et susceptibles :

- de produire des rétrovirus recombinants à des titres élevés ;
- d'être bien tolérées ;
- d'être résistantes au complément, tout en restant acceptables quant à leur sécurité ;
- d'être faciles à produire dans des conditions de bonne pratique de fabrication et ayant une stabilité dans leur expression au moins égale à 3 mois ;

- de disposer d'un gène de sélection permettant une sélection positive de celles des cellules de sang qui ont incorporé le vecteur porteur du transgène ;

- de disposer d'un système de sécurité permettant de détruire les cellules en tant que de besoin.

Pour aboutir à ces différents prérequis, il est nécessaire d'optimiser, d'une part, le choix des lignées cellulaires de départ, ainsi que le choix de chacun des constituants nécessaires à l'obtention de la particule rétrovirale recombinante infectieuse défective, en particulier, le choix des vecteurs permettant de rendre la cellule de packaging productrice des protéines gag, pol et env du rétrovirus.

En ce qui concerne la production de ces cellules dans des cultures en masse réalisées en condition de bonne pratique de fabrication (GMP) pour la production de cellules ou de virus à usage clinique, il est nécessaire d'avoir des cellules dont les caractéristiques de croissance soient parfaitement connues, avec des temps de division brefs, poussant à haute densité, le cas échéant, en suspension.

Enfin, il est nécessaire de pouvoir sélectionner à partir des cellules utilisées des transfectants stables exprimant les différents transgènes d'intérêt. Actuellement, on utilise la transduction des cellules de packaging par un vecteur unique portant le gène d'intérêt et un gène dit de sélection, ou par deux vecteurs séparés. Lors de la culture ultérieure des cellules transduites, il est en général nécessaire de maintenir la sélection pour ne pas perdre le transgène d'intérêt. Cependant, il est connu que différents types de modification peuvent aboutir à la perte d'expression du gène thérapeutique, même en présence de cette sélection. Ceci est particulièrement vrai lorsque le transgène a une certaine toxicité conférant alors un avantage sélectif aux rares cellules l'ayant perdu. L'utilisation possible de cellules déficientes en certains enzymes permettant leur sélection sur ce critère serait donc un avantage supplémentaire, surtout lorsque le gène d'intérêt thérapeutique

complémente la déficience. En d'autres termes, l'utilisation comme gène de sélection, au lieu d'un gène de résistance à un toxique (un antibiotique en général), d'un gène supplémentant une déficience génétique de la cellule présente de nombreux avantages dont l'un est la possibilité de cultiver lesdites cellules en l'absence du toxique. De plus, si ce gène est aussi le gène d'intérêt, il n'est plus possible de le perdre au cours de la sélection même lorsqu'il confère un désavantage sélectif. Ce gène peut aussi être un gène dit « de sécurité » ou « gène suicide » ce qui signifie que le produit d'expression de ce gène en présence d'une substance exogène conduit à la destruction spécifique de la cellule.

L'invention a donc pour objet des cellules eucaryotes d'emballage pour la production de virus infectieux défectifs porteurs d'un transgène caractérisée en ce qu'elles sont déficientes en une fonction cellulaire essentielle à leur croissance, notamment en présence d'un milieu de culture de sélection, ladite fonction étant susceptible d'être restaurée par l'expression d'une séquence exogène introduite dans la cellule

- soit avec un vecteur porteur des fonctions transcomplémentantes des cellules d'emballage ;
- soit avec un vecteur porteur du transgène ;
- l'expression de la séquence exogène ainsi introduite dans la cellule permettant la sélection en milieu sélectif des cellules porteuses de ladite séquence.

La cellule eucaryote d'emballage selon l'invention est caractérisée par le fait qu'elle vérifie l'un ou plusieurs des propriétés suivantes :

- elle est susceptible de produire des particules virales à un taux supérieur à 10^5 particules par ml ;
- elle est résistante au complément ou elle produit des particules virales résistantes au complément ;
- elle a un temps de division inférieur à 30 heures ;

- elle est stable au moins 3 mois dans un milieu de culture non sélectif ;

- elle est dépourvue de rétrovirus endogènes.

L'invention porte également sur des lignées d'emballage productrices de virus infectieux défectifs, porteurs d'un gène d'intérêt thérapeutique dans lequel le gène d'intérêt lui-même porté par un vecteur approprié est utilisé comme gène de sélection de la lignée d'emballage susceptible de produire les virus recombinants défectifs.

Sur cette base, plusieurs types de cellules peuvent être utilisés :

des cellules NIH-3T3 TK⁻,

a) les cellules murines NIH-3T3 qui sont actuellement largement utilisées comme cellules de packaging productrices de rétrovirus recombinants utilisés en clinique (Takahara et al. dans Journal of Virology, (1992 juin) 66 (6) 3725-32).

b) des lignées TK⁻ ont déjà été décrites dont des cellules NIH-3T3 TK⁻ (F. Wagner et al., EMBO Journal (1985), Vol. 4 n° 3, pages 663-666) ; ces cellules peuvent être tuées lorsqu'elles sont cultivées dans des milieux de culture sélectifs comme le HAT. Alors que si elles sont complémentées pour la fonction thymidine kinase, par exemple celles provenant du virus HSV1-TK, elles peuvent alors pousser en milieu sélectif ; de telles lignées offrent donc la possibilité d'utiliser le gène HSV1-TK comme gène de sélection. Le gène codant pour la thymidine kinase de HSV1 ou un de ses dérivés fonctionnels est aussi largement utilisé comme transgène à titre de prodrogue transformant le ganciclovir ou l'acyclovir en drogue cytotoxique pour la cellule, trouvant ainsi son application dans la destruction sélective de cellules, par exemple de cellules cancéreuses (voir par exemple WO 95/22617).

De manière plus générale, des cellules TK⁻ peuvent être dérivées par mutation de toute cellule susceptible d'être utilisée comme cellule d'emballage, par exemple les cellules Vero.

Ainsi, lorsque le gène thérapeutique porté par un vecteur d'expression est introduit dans une cellule de packaging déficiente pour la thymidine kinase, la sélection de la cellule de packaging ayant intégré le vecteur porteur du transgène se fait sur le gène thérapeutique lui-même, permettant ainsi d'augmenter la productivité de la culture en virus recombinaux défectifs, les cellules de packaging n'ayant pas intégré le vecteur recombinant étant ipso facto éliminées en milieu sélectif.

De manière plus générale, l'invention porte sur des cellules d'emballage déficientes en une fonction cellulaire essentielle à leur croissance et dans laquelle le transgène est susceptible de restaurer la fonction cellulaire déficiente.

Il est important que les vecteurs défectifs infectieux recombinaux porteurs d'un transgène soient résistants au complément ainsi qu'aux autres facteurs potentiellement destructeurs de virus ou de cellules dans le sang ou dans les fluides interstitiels ; pour ce faire, les lignées cellulaires de l'invention peuvent avantageusement être elles-mêmes résistantes au complément et donc préférentiellement être issues de cellules humaines ou simiennes et plus particulièrement de singes de l'Ancien Monde ou cellules humaines modifiées.

Dans le cas de cellules humaines ou simiennes, il est important de disposer de cellules dont l'origine est claire, à savoir non porteuses d'agents infectieux d'origine inconnue et capables d'infecter l'homme. La lignée 143 B TK⁻ est une lignée d'origine humaine connue (Manservigi R. et al dans Virology, (1988 Novembre) 167 (1) 284-8) ; elle a un temps de division bref c'est-à-dire d'environ dix-huit heures et elle produit des particules virales résistantes au complément. Elle peut donc avantageusement être utilisée comme cellule de packaging de l'invention. Les cellules Vero sont également largement utilisées notamment pour la production de vaccins ; ce sont des cellules simiennes qui produisent également des particules virales résistantes à la neutralisation par le complément ; les conditions de culture de ces lignées sont parfaitement

connues et une lignée déficiente en thymidine kinase pourra être obtenue par les techniques classiques et être avantageusement utilisée après transformation par les vecteurs permettant la construction de packaging, comme lignée d'emballage ayant les caractéristiques des lignées de l'invention.

La fonction d'une lignée cellulaire d'emballage de rétrovirus est de fournir les fonctions transcomplémentantes qui ont été délétées du vecteur recombinant porteur du transgène, ces fonctions étant essentiellement les gènes codant pour les protéines gag, pol et env. Ces fonctions sont exprimées de façon stable dans les cellules de packaging à partir d'un ou de préférence deux moins deux plasmides distincts afin de réduire très fortement la possibilité de générer des particules recombinantes compétentes pour la réplication. Des lignées de packaging existantes ont été réalisées à partir de protéines rétrovirales murines ou aviaires et sont décrites dans Miller AD, Hum Gene Ther, 1990 1: 5-14.

Les gènes gag et pol des rétrovirus murins sont synthétisés habituellement par le même ARN qui donne naissance à des précurseurs gag ou des précurseurs gag/pol par décalage du cadre de lecture. Ces processus sont bien optimisés dans la particule rétrovirale de type Moloney et les constructions destinées à faire la cellule d'emballage de l'invention ne toucheront pas à la structure LTR gag/pol, à l'exception de la délétion de Ψ . Le choix des gènes gag/pol ainsi que des LTR sera fait en fonction de l'objectif qui est d'avoir un taux élevé de particules virales recombinantes défectives produites élevé et par conséquent l'expression la plus forte possible de ces gènes gag/pol est recherchée.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les cellules d'encapsulation sont caractérisées en ce qu'elles comprennent :

- un vecteur porteur d'un LTR lui-même caractérisé par une bonne efficacité de transcription par exemple le LTR du virus de Friend FB29 (voir WO 96/17071) ;

- une région gag/pol issue, soit du virus de Moloney, soit du virus de Friend ou de tout autre rétrovirus à partir du moment où la structure et l'expression de cette fonction sont optimisées ;

5 c) un gène de sélection quantitative c'est-à-dire tel que lorsque l'on augmente la pression de sélection, on augmente a priori le nombre de transcrits synthétisés.

Si le gène de sélection de type quantitatif est situé sur le même plasmide que le plasmide codant pour gag et pol, l'augmentation du nombre de transcrits codant pour le gène de sélection augmente de la même manière que le nombre de transcrits codant pour gag et pol.
10 L'optimisation sera encore améliorée si l'on fait en sorte que la traduction du gène de sélection soit plus faible que celle de gag/pol.

Pour ce faire, le gène de sélection est situé soit à environ une centaine de paires de bases du codon stop de pol, soit sous le contrôle
15 d'une séquence IRES normale ou mutée (pour Internal Ribosome Entry Sites) de telle façon que l'initiation de la traduction soit moins efficace que celle des gènes gag et pol. La mutation peut consister à supprimer l'ATG principal, l'initiation se faisant alors sur un ATG moins performant préexistant ou généré par mutation.

20 Les séquences IRES sont des séquences qui ont été utilisées dans des constructions rétrovirales pour maîtriser la traduction des transcrits d'ARN polycystroniques. Les séquences IRES peuvent initier directement une traduction dans un codon d'initiation. Ainsi, l'inclusion d'une telle séquence peut permettre d'exprimer plusieurs gènes à partir du même promoteur.
25

L'autre alternative qui est de situer le gène de sélection à environ une centaine de bases du codon stop de pol permet également d'atténuer la traduction du gène de sélection par rapport à la traduction des gènes gag/pol.

30 Le gène de sélection peut également être situé sur le vecteur porteur du gène env quand celui-ci est distinct de celui portant gag/pol ;

enfin les deux vecteurs de construction de la cellule de packaging peuvent l'un et l'autre porter un gène de sélection.

Les gènes de sélection peuvent par exemple être des gènes de type BSR c'est-à-dire de résistance à la blasticidine S ou un gène de résistance à la zéomicine. Le gène de résistance à la blasticidine est un gène de sélection pour les cellules animales qui a été décrit notamment par IZUMI M. et al dans Experimental Cell Research (1991), 197 : 229-233. Ce gène semble particulièrement efficace puisqu'il a été notamment utilisé comme marqueur de sélection pour produire des hybridomes producteurs d'anticorps monoclonaux humains avec un bon rendement (Journal of Immunological methods, 1994, 177 : 17-22).

Un exemple de vecteur particulièrement approprié à la construction des lignées de packaging de l'invention est représenté dans la figure 1a.

Le deuxième vecteur utilisable pour la construction de la cellule d'emballage est porteur de gènes codants pour les enveloppes de rétrovirus. La plupart des gènes codant pour les enveloppes de rétrovirus pourraient avoir un certain degré de toxicité pour la cellule ; or, il est nécessaire d'avoir des quantités suffisantes de protéines d'enveloppe qui soient synthétisées pour que les particules rétrovirales recombinantes défectives soient bien infectieuses.

Les séquences env codant pour les peptides dérivés d'une enveloppe, par exemple oncotrope peuvent être par exemple l'enveloppe 4070a du virus de la leucémie murine de Moloney (MoMuLV). Mais, tout type de gène codant pour une protéine d'enveloppe susceptible d'être intégrée dans la membrane cellulaire au moment du bourgeonnement du rétrovirus est utilisable ; le choix de la protéine env peut être guidé par la nature du récepteur de la cellule cible que l'on souhaite transfecter par le virus rétroviral recombinant défectif. Le gène env porté par le plasmide de construction de la cellule d'emballage est sous la dépendance de séquences régulatrices de transcription virales ou non virales. Il peut s'agir

de promoteurs forts comme le promoteur du cytomégalo virus (CMV) dans le cadre de constructions génétiques telles que la présélection oblige la cellule à synthétiser des quantités importantes d'enveloppes. Par « promoteur fort », on entend toute séquence d'acide nucléique comportant le site de fixation de l'ARN polymérase ainsi que les sites de fixation des protéines régulatrices et permettant un taux élevé de transcription de la séquence située sous le contrôle dudit promoteur.

Il peut s'agir également de promoteurs inductibles qui permettraient une absence ou une expression faible d'enveloppes qui pourraient être ensuite induites de façon transitoire lors du recueil des particules virales. Par « promoteur Inductible », on entend une séquence promotrice activable à volonté par une molécule donnée ; ce type de promoteur est utilisé chaque fois que l'on désire déclencher à la demande l'expression d'un gène donné.

Des exemples de promoteurs inductibles susceptibles d'être utilisés dans la construction des cellules d'emballage de l'invention sont les promoteurs inductibles par la tétracycline décrit par Bujard et al. dans Mol. and Gen. Genetics, (1977 Dec 9) 157 (3):301-11, ou les promoteurs inductibles conditionnels tel le promoteur RAR- β (Japanese Journal of Genetics, (1993 juin) 68 (3) 175-84) ; les « promoteurs conditionnels » sont constitués d'une séquence promotrice activée par un ou des facteurs trans-régulateurs spécifiquement produits par un tissu donné, mais non nécessairement identifiés, comme par exemple le promoteur de l'insuline sensible à des facteurs strictement pancréatiques.

Ces constructions peuvent s'appliquer à tous les gènes env classiques de type 4070A du virus de la leucémie murine de Moloney (MoMuLV) ou à des enveloppes qui pourraient être utilisées en fonction de leurs propriétés particulières notamment la résistance au complément de type RD114. Des enveloppes de type HTLV1 ou dérivés de lentivirus tels que foamy virus peuvent également être utilisées.

Des gènes d'enveloppe ayant un tropisme particulier pour des cellules cibles susceptibles d'être transfectées par des virus recombinants défectifs produits par les cellules d'emballage peuvent être avantageusement utilisés, par exemple des séquences d'enveloppe de spumavirus ayant un tropisme particulier pour les cellules hématopoïétiques humaines.

Enfin, dans le cadre d'un système inductible tel que décrit plus haut, il serait alors possible d'utiliser des enveloppes de type VSV-G.

Le vecteur porteur du gène env comporte en 3' une séquence de polyadénylation telle celle issue du virus SV40. Un exemple de vecteur porteur du gène env est montré dans la figure 1b, dans laquelle ZeoR est le gène de résistance à la zéomycine.

Les deux vecteurs permettant de constituer la cellule de packaging sont bien évidemment dépourvus de séquences d'encapsulation.

Les cellules d'emballage recombinantes telles que décrites ci-dessus avec leurs différents modes de réalisation sont susceptibles d'être transfectées par un vecteur rétroviral recombinant pour l'expression et/ou l'intégration au sein du génome d'une cellule cible d'une séquence de nucléotides choisis (transgène) pour un intérêt thérapeutique. Ce transgène peut être, soit une séquence codant pour une fonction déficiente dans la cellule cible et dans laquelle on souhaite restaurer ladite fonction, ou pour introduire une fonction complémentaire et/ou régulatrice dans la cellule cible, ou encore et sans être limitatif une séquence permettant d'activer des prodrogues comme dans le cas du gène de la thymidine kinase du virus de HSV1 transformant le ganciclovir ou l'acyclovir en drogue toxique et destructrice des cellules, ou le gène de la cytosine desaminase transformant un précurseur 5 fluorouracile en drogue active ; cela peut être enfin un transgène permettant d'induire ou de stimuler le système immunitaire, soit par manipulation des cellules tumorales, soit par manipulation des cellules du système immunitaire lui-

même ou au contraire un transgène permettant de spécifiquement inhiber une réponse immunitaire dans le cas par exemple du rejet de greffe ou dans le cas de maladies auto-immunes.

5 La structure générale d'un vecteur rétroviral porteur du transgène nécessite la présence de deux LTR encadrant le ou les gènes d'intérêt ou transgènes et porte la région permettant l'encapsulation du transcrit dans la particule pseudo-rétrovirale dont les protéines de structure sont codées par la cellule d'emballage de l'invention.

10 En ce qui concerne les LTR utilisés, seront préférés, soit ceux dérivés des souches de Moloney, tels que ceux dérivés des souches Mov (réf. Jaenish) pour leur plus grande capacité à s'exprimer dans des cellules peu ou non différenciées que sont entre autres les cellules tumorales et, décrits dans la demande de brevet EP n° 0674716 où les LTR dérivés des virus de Friend pour leur haut taux d'expression comme cela a été décrit
15 ci-dessus.

L'invention porte également sur des vecteurs rétroviraux recombinants porteurs d'un gène hétérologue dont l'expression est recherchée dans une cellule cible, caractérisée en ce qu'ils comportent :

- 20 - un gène d'intérêt thérapeutique X, sous le contrôle d'un promoteur,
- une séquence nucléotidique Y dont l'expression complémente la fonction déficiente dans la cellule d'emballage,
- une séquence d'encapsulation Ψ ,
- le cas échéant un gène de sécurité Z dont l'expression en
25 présence d'une substance exogène conduit à la destruction de la cellule transfectée ou infectée.

Quand le transgène d'intérêt thérapeutique est un gène suicide par exemple celui codant pour HSV1-TK ou l'un de ses dérivés fonctionnels, les séquences X et Y ou Y et Z ne forment qu'un seul et
30 même gène, et l'utilisation d'un tel vecteur permet de sélectionner lesdites cellules d'emballage qui ont été transfectées par ledit vecteur.

Un bon titre viral dépend du nombre de transcrits encapsidables produits par la cellule d'empaquetage

L'invention porte également sur le procédé d'obtention de virus recombinants infectieux défectifs à haut titre dans les cellules telles que décrites ci-dessus et comprenant :

a) l'infection ou la transfection desdites cellules par un vecteur recombinant porteur au moins d'un gène d'intérêt thérapeutique X ;

- une séquence nucléotidique Y dont l'expression complémente la fonction déficiente de la cellule d'empaquetage si cette déficiente subsiste après construction de ladite cellule d'empaquetage par les vecteurs porteurs des gènes gal, pol et env ;

- une séquence d'encapsidation ψ ;

- et le cas échéant un gène de sécurité Z dont l'expression en présence d'une substance exogène conduit à la destruction de la cellule transfectée ou infectée ;

b) la sélection desdites cellules dans un milieu de culture de sélection dans le cas où la cellule d'empaquetage est déficiente pour une fonction donnée et que le vecteur porteur du transgène supplée cette déficience.

Quand les lignées d'empaquetage sont déficientes en thymidine kinase, le vecteur porteur du transgène sera un vecteur bicistronique permettant la sélection en présence d'un gène thymidine kinase de HSV1 ou un dérivé fonctionnel de celui-ci. Une propriété surprenante du gène HSV1-TK est que un taux d'expression élevé peut entraîner une toxicité pour la cellule, empêchant d'obtenir un nombre élevé de transcrits. Dans ce cas de toxicité du gène, la sélection des cellules productrices aboutit à l'obtention de clones dans lesquels l'expression du gène est faible et donc le titre infectieux très bas. Le vecteur de l'invention, susceptible d'infecter ou de transfecter les cellules d'empaquetage décrites ci-dessus, sera donc construit de telle façon que la production des transcrits encapsidables du transgène soit élevée en comparaison avec la

production des protéines HSV1-TK. Ainsi, une cellule d'emballage TK transfectée par un vecteur bicistronique porteur, d'une part, d'un transgène et, d'autre part, de HSV1-TK ou l'un de ses dérivés peut à la fois être sélectionnée dans le milieu sélectif HAT et être productrice de particules virales à haut titre, tout en évitant une contre-sélection due à l'activité toxique du HSV1-TK lorsque le gène est traduit activement. Ceci permet donc la réalisation de cellules d'emballage disposant d'un titre élevé et qui produisent des rétrovirus défectifs codant, soit pour HSV1-TK seul, soit pour un gène d'intérêt et HSV1-TK.

Cette différence dans la production de transcrits du transgène X, d'une part, et de Y, d'autre part, est réalisée par la construction de vecteurs recombinants dans laquelle la séquence nucléotidique Y dont l'expression complémente la fonction déficiente de la cellule d'emballage, par exemple HSV1-TK, est située soit à environ une centaine de paires de bases du codon stop du transgène, soit sous le contrôle d'une séquence de type IRES normale ou mutée telle que décrite ci-dessus de telle façon que l'initiation de la traduction de la séquence Y soit moins efficace que celle de la séquence X.

Dans le cas où le transgène est lui-même le gène permettant la sélection des cellules d'emballage, c'est-à-dire dans le cas où X et Y sont un seul et même gène (par exemple HSV1-TK), le gène d'intérêt lui-même est utilisé comme gène de sélection. Au contraire, quand le gène X et le gène Y sont différents, le gène Y peut alors assurer également une fonction de gène de sécurité Z car il permet le cas échéant de détruire les cellules transfectées avec le gène thérapeutique par traitement du malade avec une substance transformant la prodrogue en drogue toxique.

Dans le cas où la séquence Y et le cas échéant la séquence Z codent pour HSV1-TK, un exemple de réalisation du vecteur recombinant de l'invention est représenté sur la figure 2.

Dans cette figure, les deux vecteurs représentés montrent la différence entre les deux modes de réalisation permettant une moindre

expression du gène HSV1-TK (séquences Y et Z réunies), soit par une certaine distance du codon stop du gène X, soit par l'introduction d'une séquence IRES. La séquence représentée par gag* signifie que la séquence d'encapsidation peut comprendre non seulement la région génétique nécessaire à l'encapsidation mais également la partie du gène gag muté qui ne permet pas la reconstitution de la protéine gag mais qui peut augmenter l'efficacité d'encapsidation.

Les propriétés de HSV1-TK sont compatibles avec cette conception. En effet, de très faibles quantités de TK sont suffisantes pour pouvoir sélectionner en présence d'un milieu sélectif HAT des clones cellulaires dérivés de cellules TK négatives ; de la même manière, une très faible expression de TK est suffisante pour obtenir une bonne sensibilité au ganciclovir.

Dans certains cas, les trois gènes X, Y et Z ne peuvent représenter qu'un seul gène comme, par exemple, il s'agit du gène HSV1-TK qui joue à la fois le rôle de transgène, de gène de sélection, et de gène de sécurité. Une construction comme celle-ci présente l'avantage de pouvoir ajouter dans le vecteur un deuxième gène thérapeutique, par exemple un gène qui code pour des cytokines lorsque l'on souhaite éliminer des cellules cancéreuses.

Un autre mode de réalisation de l'invention, lorsque le gène TK est le gène thérapeutique lui-même, peut être caractérisé par le fait que le gène Y peut être un gène codant pour un autre marqueur de sélection par exemple le gène BSR cité plus haut ou un autre gène d'intérêt thérapeutique comme par exemple un gène de cytokine.

Pour une expression optimisée du gène Y, ce dernier peut être placé sous le contrôle d'un promoteur interne faible qui peut être lui-même atténué par un « read through » par le LTR du vecteur rétroviral. Dans cette condition le LTR 3' du vecteur peut également contenir une délétion de l'amplificateur de sorte que ce « read through » n'empêche pas

l'expression après infection de la cellule cible par les particules virales recombinantes.

De manière générale, le procédé d'obtention de virus recombinants défectifs à haut titre peut porter sur tout transgène dont l'absence induit une pression de sélection négative pour la cellule d'emballage ; une cellule ainsi déletée du gène codant pour ce transgène serait alors « sauvée » par le vecteur rétroviral qui jouerait en même temps le rôle de vecteur de sélection. Ceci s'appliquerait ainsi à tout gène cellulaire dont la surexpression induit une pression de sélection négative pour la cellule puisque seules les cellules d'emballage porteuses et productrices de rétrovirus recombinants seront sélectionnées positivement même dans le cas où l'expression du gène d'intérêt aurait tendance à contre-sélectionner ces cellules.

L'invention porte sur l'utilisation des cellules d'emballage et des vecteurs décrits ci-dessus dans la préparation d'un médicament de thérapie génique possédant les qualités de sécurité, et d'efficacité requises pour ce type de médicament, à savoir résistants au complément et ayant la possibilité d'être détruits in situ en tant que de besoin.

L'invention porte sur l'utilisation des cellules d'emballage selon l'invention et des vecteur recombinants porteurs d'un gène d'intérêt tel que décrit ci-dessus à la transformation de cellules cibles du système immunitaire telles les cellules souches hématopoïétiques, des cellules lymphocytaires ou des cellules cancéreuses.

L'invention porte également sur l'utilisation des cellules d'emballage telle que décrite plus haut dans un procédé de coculture de cellules cibles d'un rétrovirus infectieux défectif porteur d'un gène d'intérêt en thérapie génique et produit par les cellules d'emballage, ces dernières devant être impérativement détruites avant utilisation desdites cellules cibles ainsi transformées en médicaments. Il est connu en effet que certaines indications nécessitent cette coculture in vitro de la cellule cible et de la cellule d'emballage, par exemple quand la cellule

cible est une cellule du système lymphocytaire ou des cellules souches hématopoïétiques. La cellule d'emballage doit impérativement être éliminée avant la réintroduction de la cellule cible ainsi transformée. Quand la cellule d'emballage est porteuse du gène HSV1-TK comme
5 gène de sélection par exemple, l'utilisation d'un milieu de culture contenant du HAT en présence de ganciclovir et d'acyclovir peut permettre de détruire sélectivement les cellules portant le gène HSV1-TK et donc la cellule d'emballage au profit des seules cellules cibles transfectées par le virus rétroviral produit par lesdites cellules d'emballage.

10 Un autre mode de réalisation dans le cas de coculture peut être réalisé avec des cellules d'emballage directement dépourvues du gène HSV1-TK et la sélection du mélange cellulaire en présence du milieu sélectif HAT en maintenant une concentration cellulaire adéquate fait également disparaître les cellules d'emballage sans altérer les cellules
15 cibles.

REVENDEICATIONS

1. Cellule eucaryote d'empaquetage pour la production de virus infectieux défectifs porteurs d'un transgène, caractérisée en ce qu'elle est déficiente en une fonction cellulaire essentielle à sa croissance, notamment en présence d'un milieu de culture de sélection, ladite fonction étant susceptible d'être restaurée par l'expression d'une séquence exogène introduite dans la cellule.

- soit avec un vecteur porteur de fonctions transcomplémentantes des cellules d'empaquetage ;

- soit avec un vecteur porteur du transgène, et permettant la sélection en milieu sélectif des cellules porteuses de ladite séquence exogène.

2. Cellule eucaryote selon la revendication 1 caractérisée par le fait qu'elle vérifie l'une ou plusieurs des propriétés suivantes :

- elle est susceptible de produire des particules virales à un taux supérieur à 10^5 particules par ml ;

- elle est résistante au complément ou elle produit des particules virales résistantes au complément ;

- elle a un temps de division inférieur à 30 heures ;

- elle est stable au moins 3 mois dans un milieu de culture non sélectif ;

- elle est dépourvue de rétrovirus endogènes

3. Cellule selon l'une des revendications 1 ou 2 caractérisée en ce qu'elle provient d'une cellule humaine ou simienne.

4. Cellule selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que le transgène lui-même est susceptible de restaurer la fonction cellulaire déficiente.

5. Cellule selon la revendication 4 caractérisée en ce que le transgène est le gène codant pour la thymidine kinase ou pour un dérivé fonctionnel de celle-ci

6. Cellule selon l'une des revendications 3 à 5 issue de la lignée 143 B TK ou d'une cellule Vero, 3T3-TK

7. Cellule selon l'une quelconque des revendications précédentes, modifiée par transfection avec au moins deux vecteurs rétroviraux porteurs :

- pour le premier, des gènes gag/pol, sous le contrôle d'un promoteur de type LTR, une séquence de polyadénylation, le cas échéant des signaux régulateurs de transcription de gag et pol ;

- pour le deuxième, un gène codant pour une protéine d'enveloppe, sous le contrôle d'un promoteur qui sera avantageusement choisi parmi les promoteurs forts de type pCMV ou parmi les promoteurs inductibles, une séquence de polyadénylation ;

- au moins un gène de sélection pour l'établissement de la cellule en lignée de packaging qui peut être situé sur le premier ou le deuxième vecteur ;

- les susdits premiers et deuxièmes vecteurs étant dépourvus de séquence d'encapsulation.

8. Cellule d'empaquetage selon la revendication 7 caractérisée en ce que un gène de sélection est situé sur le premier vecteur et peut être notamment un gène de résistance à la Blasticidine S (gène BSR) ou à la Zeomycine (gène ZeoR).

9. Cellule d'empaquetage selon la revendication 7 ou 8 caractérisée en ce que le gène de sélection est situé, soit à environ une centaine de paires de bases du codon stop de pol, soit sous le contrôle d'une séquence de type IRES, normale ou mutée, de telle façon que l'initiation de la traduction du gène de sélection soit moins efficace que celle des gènes gag et pol.

10. Cellule d'empaquetage selon l'une des revendications 7 à 9 caractérisée en ce que le promoteur contrôlant les gènes gag et pol est le LTR du virus de Friend B29.

11. Cellule d'empaquetage selon l'une des revendications 7 à 10 caractérisée en ce que le deuxième vecteur contient également un gène de sélection différent de celui situé sur le premier vecteur, ledit gène de sélection étant situé, soit à environ une centaine de paires de bases du codon stop de pol, soit sous le contrôle d'une séquence de type IRES, de telle façon que l'initiation de la traduction du gène de sélection soit moins efficace que celle des gènes gag et pol.

12. Vecteur rétroviral recombinant porteur d'un gène hétérologue X dont l'expression est recherchée dans une cellule cible et porteur d'une séquence ψ caractérisé en ce qu'il comprend :

- une séquence nucléotidique Y dont l'expression complémente la fonction déficiente dans la cellule d'empaquetage,
- le cas échéant un gène de sécurité Z dont l'expression en présence d'une substance exogène conduit à la destruction de la cellule transfectée ou infectée.

13. Vecteur selon la revendication 12 caractérisé en ce que X et Y ou Y et Z ou X, Y et Z ne représentent qu'un seul et même gène, et que ledit vecteur permet de sélectionner les cellules d'empaquetage qui contiennent le transgène d'intérêt X.

14. Procédé d'obtention de virus recombinants à haut titre dans des cellules d'empaquetage telles que définies dans l'une des revendications précédentes comprenant :

- a) l'infection ou la transfection desdites cellules par un vecteur recombinant porteur au moins de :
- un gène d'intérêt thérapeutique X, sous le contrôle d'un promoteur,
 - une séquence nucléotidique Y dont l'expression complémente la fonction déficiente dans la cellule d'empaquetage,
 - une séquence d'encapsidation Ψ ,

- le cas échéant un gène de sécurité Z dont l'expression en présence d'une substance exogène conduit à la destruction de la cellule transfectée ou infectée,

b) la sélection desdites cellules dans un milieu de culture comprenant une substance entraînant la mort de la cellule quand la séquence Y n'est pas exprimée.

15. Procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce que la séquence Y est située, soit à environ une centaine de paires de bases du codon stop de X, soit sous le contrôle d'une séquence de type IRES, de telle façon que l'initiation de la traduction de la séquence Y soit moins efficace que celle de la séquence X.

16. Procédé selon l'une des revendications 14 et 15 dans lequel les séquences Y et Z sont identiques.

17. Procédé selon l'une des revendications 14 et 16 dans lequel le gène d'intérêt thérapeutique X et la séquence Y sont identiques.

18. Procédé selon l'une des revendications 14 à 17 caractérisé en ce que la cellule est déficiente en thymidine kinase, telle par exemple les cellules issues de la lignée 143B TK, et la séquence Y est celle du gène de la thymidine kinase de HSV1-TK ou l'un de ses dérivés fonctionnels, les cellules étant alors sélectionnées en milieu HAT, et susceptibles d'être détruites en cas de nécessité en présence de ganciclovir ou d'acyclovir.

19. Utilisation de cellules d'empaquetage selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 dans un procédé de coculture de cellules cibles d'un rétrovirus infectieux défectif porteur d'un gène d'intérêt en thérapie génique et produit par lesdites cellules d'empaquetage, ces dernières devant être détruites avant utilisation desdites cellules cibles ainsi transformées en médicament.

20. Utilisation selon la revendication 19 où les cellules cibles sont les cellules du système immunitaire telles les cellules souches hématopoïétiques ou des cellules lymphocytaires.

21 Utilisation de cellules d'emballage selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 dans la préparation d'un médicament de thérapie génique.

1/1

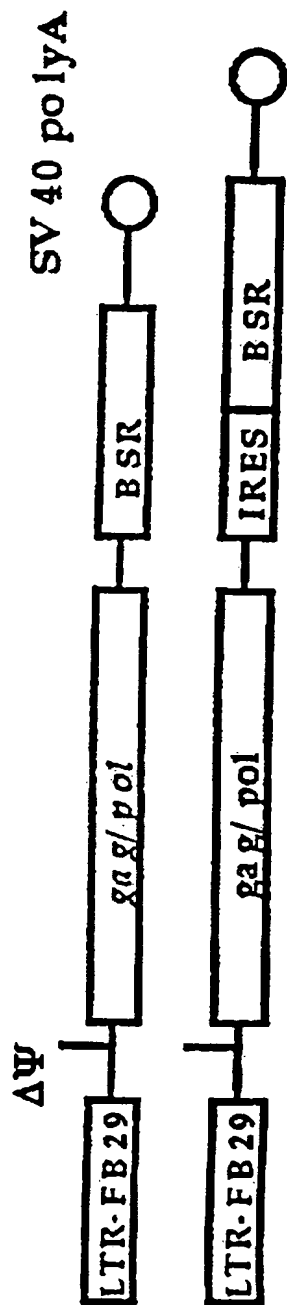


Fig. 1a

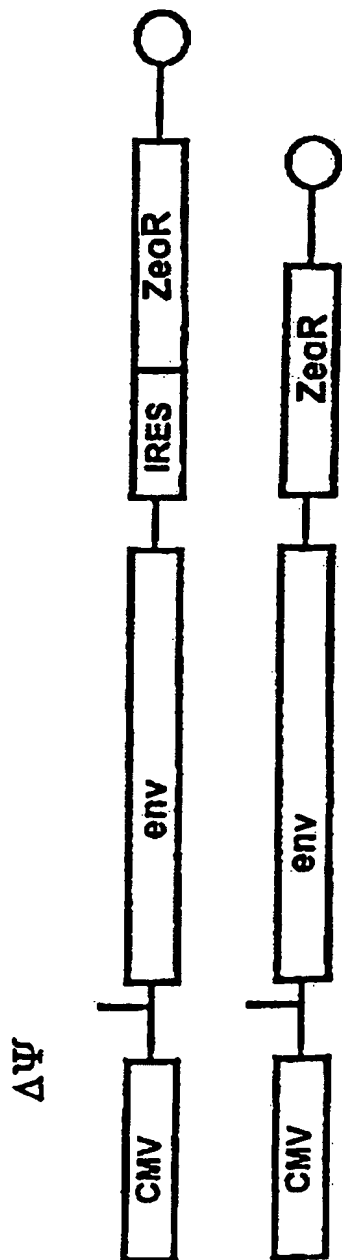


Fig. 1b

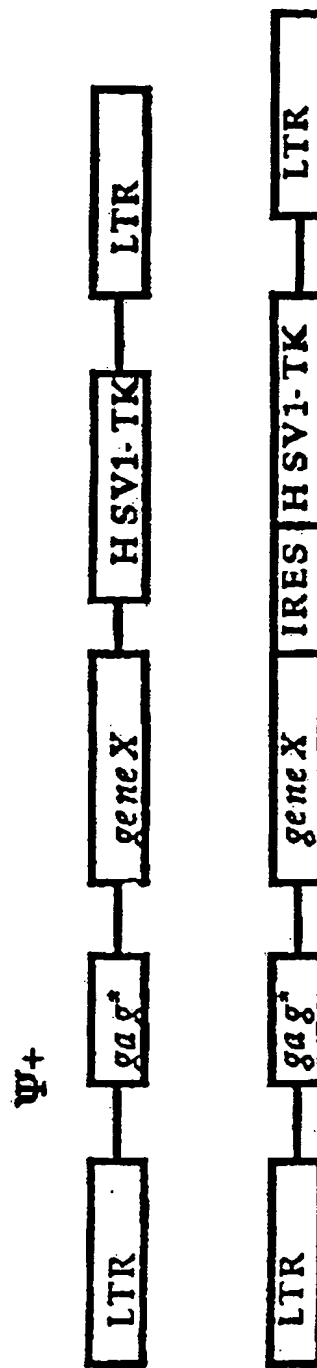


Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/FR 97/01250

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N5/10 C12N15/86

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TAKAHARA Y ET AL: "A NEW RETROVIRUS PACKAGING CELL FOR GENE TRANSFER CONSTRUCTED FROM AMPLIFIED LONG TERMINAL REPEAT-FREE CHIMERIC PROVIRAL GENES" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 66, no. 6, June 1992, BALTIMORE US, pages 3725-3732, XP000196773 cited in the application see page 3727, column 1, paragraph 2 - page 3730, column 2, paragraph 1; figures 1-5 see page 3725, column 1, last paragraph - page 3726	1-5, 12-14
X	US 5 470 726 A (MILLER A. DUSTY ET AL.) 28 November 1995 see the whole document	1-3,7, 12,14

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 October 1997

Date of mailing of the international search report

18.11.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.

PCT/FR 97/01250

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 93 10218 A (US GOVT. HEALTH AND HUMAN SERVICES DEPT.) 27 May 1993</p> <p>see abstract; examples 1-5 see page 6, line 3 - page 8, line 6</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>1,2,4,5, 7,12-14, 18</p>
X	<p>WO 94 13824 A ((UNIVERSITA PIERRE ET MARIE CURIE) 23 June 1994</p> <p>see abstract; figure 1 see page 4, line 10-30 see page 5, line 5-26 see claims 1-7 & EP 0 674 716 A 4 October 1995 cited in the application</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>1,4,5, 10, 12-14, 19,21</p>
A	<p>MANSERVIGI R ET AL: "CONSTITUTIVE EXPRESSION IN HUMAN CELLS OF HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 1 GLYCOPROTEIN B GENE CLONED IN AN EPISOMAL EUKARYOTIC VECTOR" VIROLOGY, vol. 167, no. 1, November 1988, ORLANDO US, pages 284-288, XP000196774 cited in the application see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>1-6</p>
A	<p>IZUMI M ET AL: "BLASTICIDIN S-RESISTANCE GENE (BSR): A NOVEL SELECTABLE MARKER FOR MAMMALIAN CELLS" EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, vol. 197, 1991, NEW YORK US, pages 229-233, XP000196772 cited in the application</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>8</p>
A	<p>WO 96 17071 A (COHEN-HAGUENAUER ODILE) 6 June 1996 cited in the application</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l Application No

PCT/FR 97/01250

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5470726 A	28-11-95	NONE	
WO 9310218 A	27-05-93	NONE	
WO 9413824 A	23-06-94	FR 2699191 A CA 2150536 A EP 0674716 A JP 8506722 T	17-06-94 23-06-94 04-10-95 23-07-96
WO 9617071 A	06-06-96	FR 2727429 A AU 4306996 A EP 0796338 A	31-05-96 19-06-96 24-09-97

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De: le Internationale No
PCT/FR 97/01250

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N5/10 C12N15/86

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	TAKAHARA Y ET AL: "A NEW RETROVIRUS PACKAGING CELL FOR GENE TRANSFER CONSTRUCTED FROM AMPLIFIED LONG TERMINAL REPEAT-FREE CHIMERIC PROVIRAL GENES" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 66, no. 6, juin 1992, BALTIMORE US, pages 3725-3732, XP000196773 cité dans la demande voir page 3727, colonne 1, alinéa 2 - page 3730, colonne 2, alinéa 1; figures 1-5 voir page 3725, colonne 1, dernier alinéa - page 3726	1-5, 12-14
X	US 5 470 726 A (MILLER A. DUSTY ET AL.) 28 novembre 1995 voir le document en entier - / - -	1-3,7, 12,14

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

8 octobre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18. 11. 97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Panzica, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De Je Internationale No

PCT/FR 97/01250

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>WO 93 10218 A (US GOVT. HEALTH AND HUMAN SERVICES DEPT.) 27 mai 1993</p> <p>voir abrégé; exemples 1-5 voir page 6, ligne 3 - page 8, ligne 6</p> <p>---</p>	<p>1,2,4,5, 7,12-14, 18</p>
X	<p>WO 94 13824 A ((UNIVERSITA PIERRE ET MARIE CURIE) 23 juin 1994</p> <p>voir abrégé; figure 1 voir page 4, ligne 10-30 voir page 5, ligne 5-26 voir revendications 1-7 & EP 0 674 716 A 4 octobre 1995 cité dans la demande</p> <p>---</p>	<p>1,4,5, 10, 12-14, 19,21</p>
A	<p>MANSERVIGI R ET AL: "CONSTITUTIVE EXPRESSION IN HUMAN CELLS OF HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 1 GLYCOPROTEIN B GENE CLONED IN AN EPISOMAL EUKARYOTIC VECTOR" VIROLOGY, vol. 167, no. 1, novembre 1988, ORLANDO US, pages 284-288, XP000196774 cité dans la demande voir le document en entier</p> <p>---</p>	<p>1-6</p>
A	<p>IZUMI M ET AL: "BLASTICIDIN S-RESISTANCE GENE (BSR): A NOVEL SELECTABLE MARKER FOR MAMMALIAN CELLS" EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, vol. 197, 1991, NEW YORK US, pages 229-233, XP000196772 cité dans la demande</p> <p>---</p>	<p>8</p>
A	<p>WO 96 17071 A (COHEN-HAGUENAUER ODILE) 6 juin 1996 cité dans la demande</p> <p>-----</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den Internationale No

PCT/FR 97/01250

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5470726 A	28-11-95	AUCUN	
WO 9310218 A	27-05-93	AUCUN	
WO 9413824 A	23-06-94	FR 2699191 A	17-06-94
		CA 2150536 A	23-06-94
		EP 0674716 A	04-10-95
		JP 8506722 T	23-07-96
WO 9617071 A	06-06-96	FR 2727429 A	31-05-96
		AU 4306996 A	19-06-96
		EP 0796338 A	24-09-97

*** NOTICES ***

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

High capsid-ized system of production capacity The purpose of this invention is in the new cell lineage which produces the recombination retrovirus of a high potency which can be used for Homo sapiens in heredity ***** and which is called a capsid-ized system (packaging system).

The transgenics by the recombination retrovirus is used widely current and not only within the limit [of a clinical trial] but because of an experimental-research activity.

: which the retrovirus vector used under these situations differ is produced by the system usually called <<packaging>>, packaging, or a transformer complement (transcomplementation) system, and has the semantics with these three same vocabulary -- these systems are the cells by which transduction was carried out using the gene construct which enables the compositionality manifestation of different protein required for manufacture of the retrovirus particle containing structural protein and an enzyme required for those infectivity. The purpose of a capsid-ized system is to offer the gene which carries out the code of gag, pol, and env protein which the genome vector which has a "helper" function and the introductory gene with which the manifestation is especially investigated by use of the infectivity defective virus does not have by transformer complement. The these "helper" function which is not equipped with Array psi is discovered in the form stabilized in the transformer complement cell after the transfection of the unit which contains them and by which the RNA transcript is not capsid-ized in virion as a result of the deletion of the capsid-ized array psi, or two or more plasmids. When these capsid-ized cells receive the transfection by the vector which has an introductory gene next, the virus protein gag produced by the packaging cell can capsid-ize the retrovirus vector which has an introductory gene in the virion by which a salting-out is carried out after that within an environment. (Refer to Miller AD Gene Ther

and 1990 1:5–14 about an outline) .

The packaging system of a different type is realized based on this general principle, and it is used widely today. However, these systems do not exist especially at the thing which can be optimized according to the use or specific approach for a specific introductory gene. Especially a means to extinguish the cell which received the transduction with which the patient was medicated when an introductory gene or its guided manifestation product induced the effectiveness which is not desirable (an unsuitable manifestation or unsuitable insertion) does not exist at all. Another side face in which it becomes a reason for being important securing the packaging cell which may be destroyed when required is a problem on insurance strictly [because it turns out to be that recombination may draw the formation of an infectivity virus based on a packaging system].

Selection of the start cell which can realize a packaging system in inside is seen from the property expected and its potential clinical use, and is very important. The greater part of all cell lineage used clinically is guided despite former, the fibroblast, i.e., the NIH–3T3 cell, of the mouse origin. The transformation is not received [that the advantage of these cells is fully characterized,] (a neoplasm is not started when again poured in by *in vivo*), It is in being a thing originating in the animal it being bred covering many generations and not presenting the specific illness (for example, neurodegenerative type illness) which leaves possibility of making existence of an infective infectivity effector suspecting in the body, as a result in the cell used potentially turns out to be. the result of limit of a seed that use of the cell of a mouse is moreover frequently observed in infection pathology -- strange transfer -- a sexual feeling -- in contamination by the stain effector, additional safety is offered. However, one of the faults which the cell of a mouse has originates in the viruses produced by these cells and these cell itself being quickly neutralized by human complement in almost all cases. A simple means to amend this fault is to produce a packaging cell from the cell of other kinds with the resistance over a human cell or human complement. however, in the case of a human cell, it is boiled occasionally, is carried out, and the transformation of it is carried out, therefore it has the latency of a neoplasm. The possibility of the contamination by the infectivity effector which the generation source which may be infected with the origin and human being of a cell with a natural thing moreover does not understand is not known in detail.

Although the cell of an ape can be used like a human cell for the property which makes the virion which is not destroyed by complement, these cells actually have the same defect as a human cell about the possibility of the existence of an infection active substance.

This may be the cell of the mouse with which the gene which gives [rather

than] big resistance to human complement and/or a human blood serum was introduced into inside.

Especially these genes may be CD46, CD55, C1 inhibitor (C1INH), protein H, fusibility CR 1, and the polymer gestalt that was described by especially the patent FR No. 9508901.

The purpose of this invention amends the unit of the above-mentioned problems, or two or more things in part at least. – It rearranges with a high potency and a retrovirus can be produced. – Tolerance may fully be carried out. – Remaining in a permissible condition about the safety It can have resistance to complement. – In the manifestation, it has the stability for three months or more. It can produce easily under good practical use manufacture conditions. – The selector genes which enable forward selection of the blood cell which incorporated the vector which has an introductory gene are securable. – It is in offering a preparation means of a new KABUSHIDO-ized system by which the safety system which can destroy a cell if needed is securable.

In order to attain these different prerequisites, on the other hand, it is required to optimize selection of start cell lineage and each selection of a component required for acquisition of an infectivity deficit recombination retrovirus particle, especially selection of the vector which can make a packaging cell what produces gag, pol, and env protein of a retrovirus. The practical use manufacture conditions which excelled for production of the virus of a clinical application, and a cell (GMP)

It is required to obtain the cell which is short division time amount and is generated by the high consistency in the state of suspension about production of these cells in the mass culture realized in the bottom depending on the case and which has a well-known growth property completely.

It is required to be able to choose stable transformer FEKUTANTO which discovers a different convenient introductory gene from the cell used at the end. The transduction of the only vector containing current and a convenient gene and the so-called selector genes, or the packaging cell by two separated vectors is used. In the case of the culture of the after that of a cell by which transduction was carried out, generally, it is required to maintain selectivity so that a convenient introductory gene may not be lost. However, it is also known as a result of the alteration of the type with which even the bottoms of existence of this selectivity differ that the gene expression for a therapy may be lost. this -- especially -- an introductory gene -- an alternative advantage -- ***** -- it is being able to say, when it has the fixed trauma nature which will give it to a rare cell.

Therefore, the availability of the cell into which the enzyme of a certain kind which enables that selection based on these criteria suffered a loss becomes

one additional advantage, when the gene for a therapy complements that deficit especially. When it puts in another way, there are many advantages including possibility of cultivating said cell in the condition that there is no toxic material in using the gene which supplements with the hereditary deficit of a cell instead of a gene with the resistance over a toxic material (generally antibiotic) as selector genes. the case which is a gene with them where it will give the disadvantageous point on selection if it becomes -- between selections -- this -- ***** -- it is impossible. [moreover, this same gene, and] [convenient]

This gene may be the so-called "safety" gene or a "suicide gene" similarly, and this means that this gene expression product under existence of the exogenous matter draws specific destruction of a cell.

Therefore, this invention is set to the packaging eukaryotic cell for production of the infectivity defective virus which has an introductory gene. The indispensable cell function is missing to that growth especially under existence of a selective medium. This function - With the vector which has the transformer **** function of a packaging cell Or - Are recoverable with the manifestation of the exogenous array introduced into this intracellular one with the vector containing an introductory gene. And the manifestation of the exogenous array introduced into intracellular in this way aims at the packaging eukaryotic cell characterized by enabling selection within the selective medium of the cell which has said array.

The packaging eukaryotic cell by this invention is -. Virion can be produced at a rate of 10⁵ or more [per ml] particles.;

- The virion which has the resistance over complement with the resistance over complement in itself is produced.;
- It has less than 30-hour division time amount.;
- It has the stability for at least three months within a non-selectivity culture medium.;
- It is characterized by being what checks one or more things of the properties; which is not equipped with the endogenous retrovirus. This invention relates also to the packaging system in which the convenient gene contained by the vector suitable again in itself produces the infectivity defective virus which is used as selector genes of the packaging system which can produce a deficit recombination virus, and which has a gene for a therapy.

: which can use the cell of two or more types on the basis of this -- namely, -- NIH-3 T3 TK-cell a NIH-3T3 cell (Takahara et al. Journal of Virology (June, 1992) (6)66 3725-32) of the mouse widely used now as a packaging cell which produces the recombination retrovirus used by clinical.

b) ; TK-system containing a NIH-3 T3 TK-cell has already been described to be (F, Wagner et al., EMBO Journal (1985), and 4th volume No. 3,663-666

pages) -- these cells may become extinct when cultivated within a selective medium like HAT. Although these cells originate for example, in a HSV1-TK virus and they are complementary about a thymidine kinase function [like], they may be generated within a selective medium at this time. Therefore, such a system offers possibility of using a HSV1-TK gene as selector genes. The gene which carries out the code of one of the thymidine kinase of HSV1 or the functional derivative of its is similarly used widely as an introductory gene as a prodrug which converts ganciclovir or aciclovir into cell trauma nature, therefore is applied to alternative destruction of a cell called for example, a gun cell (for example, WO95/22617 reference).

Still more generally TK-cell may be guided by the mutation of all the cells that can be used as a packaging cell called a Vero cell.

Therefore, when the gene for a therapy contained in an expression vector is introduced into deficit packaging intracellular for a thymidine kinase, selection of the packaging cell incorporating the vector which has an introductory gene is performed about the gene for a therapy itself, therefore the productivity of culture of a deficit recombination virus increases, and the packaging cell which did not incorporate a recombination vector is taken and removed within a selective medium as an inevitable result.

More generally this invention relates to the packaging cell into which the cell function indispensable to the growth in which the cell function to which the introductory gene suffered a loss is recoverable suffered a loss.

It is important that the recombination infectivity deficit vector which has an introductory gene has resistance to the factor of others which destroy potentially the virus or cell in complement and blood, or the interstitial fluid. Therefore, the cell lineage of this invention may have resistance [conveniently as opposed to complement] in itself, therefore, more specifically, may be Homo sapiens or the cell of an ape, and a thing originating in the cell of the ape in the old world (Asia, Europe, North Africa), or the changed human cell preferably.

In the case of the cell of Homo sapiens or an ape, the origin has clarified, i.e., it is important to secure the cell which does not have the infectivity effector which the origin is not known but may be infected with human being. 143

BTK-System is System of Known Homo Sapiens Origin (Manservigi R Et Al). 167in Virology (November, 1988) (1)284-8; -- this produces the virion which has short paddle division time amount, i.e., about 18-hour division time amount, and has the resistance over complement. Therefore, this is conveniently available as a packaging cell of this invention.

The Vero cell is used widely especially because of production of a vaccine similarly. This is the cell of the ape which produces the virion which has the resistance over neutralization by complement similarly. The culture condition of these systems is completely well-known, and the system in which the

thymidine kinase is missing can be conveniently used after the transformation by the vector which enables the configuration of packaging as a packaging system which can obtain by the Prior art and has the description of the system of this invention.

The function of the packaging cell lineage of a retrovirus is for the recombination vector which has an introductory gene to offer the transformer complement function which suffered a loss, and these functions are genes which carry out the code of the protein gag, pol, and env fundamentally.

It is made to discover these functions in the form stabilized in packaging intracellular from one or at least two plasmids which are completely preferably different so that possibility of generating a recombinant particle with the competence to a duplicate may be reduced extremely. The existing packaging system is made from the retrovirus protein of a mouse or a bird, and is described within Miller AD, Hum Gene Ther, and 1990 1:5 -14.

gag and the pol gene of a retrovirus of a mouse are compounded by the usually same RNA as generating a gag precursor or a gag/pol precursor by the shift of an open reading frame. This process is fully optimized in the retrovirus particle of a MORONI mold, and the construct for making the packaging cell of this invention does not touch the LTR structure of gag/pol except for the deletion of psi. Selection of a gag/pol gene and LTR will be performed according to the target to make high the rate of the recombination defective-virus particle produced, therefore the manifestation of these gag/pol genes greatest as much as possible is called for.

For a capsid-ized cell, it is - when one embodiment of this invention is followed. For example, vector which has LTR characterized by the imprint effectiveness which was excellent in itself which is called LTR of Friend virus FB29 (refer to WO 96/17071);

- As long as the structure of the function and a manifestation are optimized, they are the Moloney's virus, the Friend virus, or the gag/pol field that originates in all retroviruses in addition to this.;

c) Selector genes to which the imprint significant work which will be experimentally compounded if it increases in quantitative selection, i.e., a selection pressure, increases;

***** -- it is characterized by things.

When the selector genes of a quantum mold are on the same plasmid as the plasmid which carries out the code of gag and the pol, the increment in the imprint significant work which carries out the code of the selector genes increases in the same way as the imprint significant work which carries out the code of gag and the pol. Optimization will improve further, when it is made for the translation of selector genes to become smaller than the translation of gag/pol.

For this reason, selector genes are positioned in the place of about 100 base pairs from the halt codon of pol, it is put under the control of the IRES array (about the internal ribosome penetration section : Internal Ribosomal Entry Site) from which ** received mutation it is [control] normal, therefore effectiveness worsens [initiation of a translation] rather than gag and a pol gene. Mutation may consist of deleting main ATG(s), and at this time, initiation is existing or is performed on ATG with the comparatively low engine performance generated by mutation.

An IRES array is an array used in a retrovirus construct in order to control the translation of a polycistron RNA transcript. An IRES array can make direct translation start within an initiation codon. Therefore, by carrying out entailment of such an array, it becomes possible to discover two or more genes from the same promotor.

Another alternative of positioning selector genes in the place of about 100 bases from a pol halt codon makes it possible similarly to attenuate the translation of selector genes compared with the translation of a gag/pol gene.

; which positions selector genes similarly on the vector which has this env gene when the vector which has an env gene is a completely different thing from the vector which has gag/pol, and may be carried out -- in short, two vectors which constitute a packaging cell can have selector genes for both. Selector genes may be a gene, i.e., a blasticidin S resistance gene, or a ZEOMAISHIN resistance gene BSR type [for example,]. Especially brass CHISHIJIN resistance genes are the selector genes for Experimental Cell Research (1991) and the animal cell described by IZUMI M et al in 197:229-233. Since this gene was used especially as a selective marker for producing a human monoclonal antibody production hybridoma with the outstanding yield, it is thought that especially effectiveness is good. (Journal of Immunological methods, 1994, 177; 17-22) An example of the vector suitable for especially the configuration of the packaging system of this invention is shown in drawing 1 a.

The 2nd vector which can be used for the configuration of a packaging cell has the gene which carries out the code of the retrovirus envelope. Most genes which carry out the code of the retrovirus envelope may have the trauma of fixed level to a cell. However, in order for a recombination deficit retrovirus particle to have sufficient infectivity, it is required to have envelope protein of sufficient amount compounded.

For example, the env array which carries out the code of the peptide guided from an envelope which is both kind directivity (enphotrope) may be the envelope of 4070a of for example, a MORONI murine leukemia virus (MoMuLV). However, selection of :env protein with all the available genotypes that carry out the code of the envelope protein which it is at the germination

time of a retrovirus and may be incorporated in a cell membrane may be drawn with the property of the receptor of a target cell in which transfection by the recombination deficit retrovirus is desired. It depends on a virus or a non-virus transcriptional control array for the env gene which the configuration plasmid of a packaging cell has. That is, it is thought that this is a powerful promotor like a promotor of the cytomegalovirus (CMV) of a gene construct within the limit who makes a cell compound a lot of envelopes compulsorily by preliminary selection. "Powerful promotors" is all nucleic-acid arrays that enable an imprint at the high rate of the array which at least an RNA polymerase fixed part has at least the fixed part of regulatory protein, and is under control of a promotor like a parenthesis. An induction promotor who enables lack or a low manifestation of the envelope which may be temporarily induced after that in the case of collection of virion may also pose a problem similarly here. An "induction promotor" is the promotor array which can be activated at will with a predetermined molecule. this type of promotor is alike each time and is used to start predetermined gene expression according to a demand. In the configuration of the packaging cell of this invention as an available induction promotor's example the induction promotor by the tetracycline described by Bujard et al in Mol.and Gen.Genetics(1977 September)157(3);301-11 -- or conditional [like promotor RAR-beta (Japanese Journal of Genetics (June, 1993) (3)68 175-84)] --; with an induction promotor -- "-- conditional -- promotor" For example, although it is specifically produced by the predetermined organization as it was called the promotor of the insulin which has susceptibility to the factor of the pancreas strictly, it consists of promotor arrays activated by the unit or two or more transformer regulators which are not necessarily identified. These constructs are applicable to an available envelope according to all the conventional env genes of 4070A molds of a MORONI murine leukemia virus (MoMuLV), or a specific property of those especially like the resistance over the complement of RD114 type. The envelope of HTLV1 type or the derivative of lentivirus like the foamy virus can be used similarly. The envelope gene which has specific compatibility to the target cell which may rearrange and may receive the transfection by the defective virus produced by the packaging cell is conveniently available like the envelope array of a SUPUMA virus which has specific compatibility for example, to a Homo sapiens hematopoietic cell. Finally, within the limit of an induction system which was described above, it will become possible to use a VSV-G type envelope at this time. The vector which has an env gene has a polyadenylation array which originates in an SV40 virus in 3'. An example of the vector which has an env gene is shown in drawing 1 b, and ZeoR is a ZEOMAISHIN resistance gene

among this drawing.

Two vectors which enable it to constitute a packaging cell are not equipped with the capsid-ized array with the natural thing.

a recombination packaging cell which was mentioned above together with the different embodiment rearranges for the manifestation inside the genome of the target cell of the nucleotide sequence (introductory gene) chosen as the therapy, and/or a nest and is retro -- oui, the transfection by the RUSUSU vector can be received. The array expected for this introductory gene to carry out the code of the deficit function in a target cell, and to recover this function in it, Or additional in a target cell and/or the array for introducing the function for accommodation, Or the gene of the thymidine kinase of HSV1 virus which converts ganciclovir or aciclovir into the restrictive poisonous drug which destroys a cell meaningless, Or it may be the array which makes it possible to activate a prodrug like [in the case of the gene of the cytosine deaminase which converts 5 fluorouracil precursor into an activity drug]. or [that this finally induces an immune system by actuation of a tumor cell, or actuation of the cell of the immune system itself] -- or you may be the introductory gene which can be stimulated or may be the introductory gene which can check an immune response specifically the case of graft rejection, and in the case of an autoimmune disease on the contrary. The general structure of the retrovirus vector which has an introductory gene needs existence of two LTR which encloses the convenient gene or the introductory gene of an unit or plurality, and it has the field which enables capsid-ization of the imprint object in a SHUDO retrovirus particle with the structural protein in which a code is carried out by the packaging cell of this invention.

About LTR used, LTR guided from the Friend virus for reasons of the high incidence rate as mentioned above or LTR guided from MORONI strain, such as the LTR (refer to Jaenish) by which a ***** tumor cell comes out so and is discovered in a certain most or the cell which has not specialized at all, and which was caused, was guided from Mov strain for reasons of big capacity, and was described in patent application EP No. 0674716, is liked.

It sets to the recombination vector which has similarly the non-homologous gene with which it searches for the manifestation in a target cell, and this invention is -. Gene X for a therapy under one control of a promotor;

- Nucleotide sequence Y with which the manifestation complements a packaging intracellular deficit function;

- Capsid-ized array psi;

- Insurance gene Z which draws destruction of the cell from which the manifestation under existence of the exogenous matter received transfection or infection depending on the case;

It is related also with the recombination retrovirus vector characterized by

****(ing).

When the introductory gene for a therapy is a suicide gene which carries out the code of one of HSV1-TK or its functional derivatives, Arrays X and Y, or Y and Z form only the same only gene, but use of such a vector makes it possible to choose said packaging cell which received the transfection by this vector.

the outstanding virus titer was produced by the packaging cell -- capsid -- it is influenced by the imprint significant work [-izing / significant work].

this invention -- the same -- a -- at least -- Gene Xfor therapy;

– Nucleotide sequence Y with which that manifestation complements the deficit function of a packaging cell when this deficit continues after the configuration of the packaging cell by the vector which has gal, pol, and an env gene;

– Capsid-ized array psi;

– Insurance gene Z which draws destruction of the cell from which the manifestation under existence of the exogenous matter received transfection or infection depending on the case;

Infection or transfection of said cell by recombination BETAKU which ****;

b) Selection of said cell within a selective medium in case the vector which the packaging cell is missing in the predetermined function, and has an introductory gene supplements with this deficit;

It is related also with the acquisition approach of ***** and the recombination infectivity defective virus of a high potency in the inside of the cell as above-mentioned.

When the thymidine kinase is missing in the packaging system, the vector which has an introductory gene turns into a JISHISU TRON vector which makes selection possible under existence of the thymidine kinase gene of HSV1 or its functional derivative. A high incidence rate causes the trauma over a cell, and the property that a HSV1-TK gene is surprising has it in having barred acquisition of many imprint objects. In the case of this trauma of a gene, selection of a cell with production capacity draws acquisition of a clone with a very low infectivity potency weakly [gene expression]

therefore. therefore, an above-mentioned packaging cell -- infection or the vector of this invention which can carry out transfection -- an introductory gene -- capsid -- production of the imprint object [-izing / an object] will consist of forms which become high compared with production of HSV1-TK protein. Therefore, while packaging cell TK- which received the transfection by the JISHISU TRON vector which has an introductory gene on the other hand, and has one of HSV1-TK or the derivative of its on the other hand can produce the virion of a high potency, avoiding the counter selection resulting from the poisonous activity of HSV1-TK when a gene is translated actively, it is also selectable within a HAT selective medium. Therefore, the deficit

retrovirus which carries out the code of the HSV1-TK to a HSV1-TK independent or a convenient gene is produced in this way, and it becomes realizable [the packaging cell which has a high potency].

On the other hand on introductory gene X another side, this difference in production of the imprint object of Y For example, [whether nucleotide sequence Y with which the manifestation complements the deficit function of a packaging cell called HSV1-TK is positioned at the place of about 100 base pairs from the halt codon of an introductory gene, and] or the bottom of control of the IRES mold array which received the **** mutation which is the above normal -- initiation of a translation of he, therefore Array Y is realized by the configuration of the recombination vector used as what has bad effectiveness from the translation of Array X.

When the introductory gene itself is a gene which enables selection of a packaging cell (i.e., when X and Y are the same only genes (for example, HSV1-TK)), a convenient gene is used as selector genes in itself. When Gene X differs from Gene Y on the contrary, the function of the insurance gene Z can achieve Gene Y similarly.

This is because it enables it to destroy the cell which received transfection with the gene for a therapy by treating a patient by the matter by which this gene Y converts a prodrug into a poisonous drug when it corresponds.

When Array Z carries out the code of HSVI-TK depending on Array Y and the case, the example of the recombination vector of this invention is expressed to drawing 2 .

distance with two vectors fixed from the halt codon of Gene X displayed in this drawing -- or two operative conditions which enable a manifestation smaller than that [gene HSV1-TK (what Arrays Y and Z unified)] by installation of an IRES array -- the difference is shown while like. The array expressed with gag* means that the part of the gag gene which can raise the effectiveness of capsid-izing and which carried out mutation can be included, although a packaging array does not enable reconstruction of not only a gene field required for capsid-izing but gag protein.

The properties of HSV1-TK are this concept and a compatible **** thing. In order to be actually able to choose the cell clone to which negative TK cell was guided under existence of a HAT selective medium, very little TK is enough. In order to acquire the outstanding susceptibility over ganciclovir similarly, very slight TK manifestation is enough.

Three genes X, Y, and Z may express only the only gene with coincidence to a certain kind of case like [in gene HSV1-TK which achieves the duty of an introductory gene, selector genes, and an insurance gene]. Such a construct presents the advantage that the 2nd gene for a therapy like the gene which carries out the code of the cytokine can be added in a vector to remove for example, a gun cell.

When TK gene is the gene for a therapy itself, another embodiment of this invention can be characterized by for Gene Y being another gene for a therapy like for example, the gene which carries out a code, or a cytokine gene, and acquiring another selective marker like an above-mentioned BSR gene, for example.

Lycium chinense grows in the bottom of control of the weak internal promotor who can decrease this gene Y by "the readthrough (read through)" by LTR of a retrovirus vector in itself for the manifestation by which Gene Y was optimized. The deletion of an amplifier can be contained in a form which this "readthrough" rearranges LTR3' of a vector similarly under these conditions, and does not bar the manifestation after infection of the target cell by virion.

Generally, the cell to which; which is a thing in connection with all introductory genes by which the negative selection pressure to a packaging cell is induced, thus the gene which carries out the code of this introductory gene carried out deletion of the acquisition approach of the recombination defective virus of a high potency when it was lacked becomes what "is helped" by the retrovirus vector which plays the role of a selection vector in coincidence at this time. Probably an above-mentioned thing follows and is applied to all cytogenes to which the superfluous manifestation induces the negative selection pressure for a cell, in order that only the packaging cell which has a recombination retrovirus and produces it may receive forward selection, even when it has the inclination for convenient gene expression to make counter selection of it.

This invention relates to the above-mentioned packaging cell in preparation of such drugs for gene therapies which has possibility of being destroyed by in situ if needed [resistance and if needed] over the advantage, i.e., the complement, of the safety aspect and effect side which are needed for the drugs for gene therapies, and use of a vector.

This invention relates to use of the packaging cell by the recombination vector and this invention in the transformation of the target cell of an immune system like a hematopoietic stem cell, a lymph cell, or a gun cell which have a convenient gene as above-mentioned.

This invention relates also to use of the packaging cell as above-mentioned in the cocultivation approach of the target cell of the infectivity deficit retrovirus which has similarly the gene for gene therapies produced by the packaging cell. In addition, said packaging cell must be absolutely destroyed here before use of said target cell which did in this way and was converted into drugs. In fact, it is known like [in case a target cell is the cell or hematopoietic stem cell of the lymphatic system] that this cocultivation in vitro of a target cell and a packaging cell is needed for a certain kind of adaptation. A packaging cell must be removed before reintroduction of the

target cell converted in this way. When a packaging cell has a HSV1-TK gene like selector genes, cell ***** which has a HSV1-TK gene can make it possible to destroy a packaging cell alternatively so that conveniently [use of the culture medium which contains HAT under existence of ganciclovir and aciclovir / the only target cell which received the transfection by the retrovirus produced by said packaging cell].

Another embodiment in the case of cocultivation is also realizable using the packaging cell which originally does not have the HSV1-TK gene, and a packaging cell can be extinguished, without denaturing a target cell similarly by choosing cell mixture under existence of a HAT selective medium, maintaining suitable cell concentration.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

In Packaging Eukaryotic Cell for Production of Infectivity Defective Virus Which Has Introductory Gene, Indispensable Cell Function is Missing to the Growth Especially under Existence of Selective Medium. 1. This Function – With the vector which has the transformer complement function of a packaging cell or – – Vector which has an introductory gene Packaging eukaryotic cell characterized by enabling selection within the selective medium of the cell into which the manifestation of the exogenous array introduced into this intracellular one can recover, and this manifestation moreover has said exogenous array.

2. – Virion can be produced at a rate of 10⁵ or more [per ml] particles.;
- The virion which has the resistance over complement with the resistance over complement is produced.;
- It has less than 30-hour division time amount.;
- It has the stability for at least three months within a non-selectivity culture medium.;
- The endogenous retrovirus is not equipped.;

The eukaryotic cell according to claim 1 characterized by being what checks one or more things of the properties to say.

3. Cell according to claim 1 or 2 characterized by originating in cell of Homo sapiens or ape.

4. Cell given in any 1 term of claims 1–3 characterized by the ability of introductory gene itself to recover deficit cell function.

5. An introductory gene is a cell according to claim 4 characterized by being the gene which carries out the code of a thymidine kinase or its functional derivative.

6. Cell given in any 1 term of claims 3–5 originating in system 143BTK– or Vero cell 3 T3–TK–.

7. – It is the gal/pol gene which is under control of the transcriptional control

signal of gag and pol about the first thing depending on an LTR type promotor, a polyadenylation array, and the case.;

– They are the promotor who will be conveniently chosen from a powerful pCMV type promotor or an induction promotor about the 2nd thing, and the gene which carries out the code of the envelope protein under control of a polyadenylation array.;

– At least one selector genes for establishment of the cell in the form of the packaging system which may be positioned on the 1st or 2nd vector;

A cell given in any 1 term of claims 1–6 changed by the transfection in at least two retrovirus vectors which **** and moreover do not have a capsid-ized array.

8. Packaging cell according to claim 7 characterized by being gene in which selector genes are on the 1st vector and have resistance especially to blasticidin S (BSR gene) or ZEOMAISHIN (ZeoR gene), and obtaining.

9. Packaging cell according to claim 7 or 8 characterized by for selector genes being in place of about 100 base pairs from halt codon of pol, being under control of array of IRES type which received **** mutation which is normal, therefore initiation of translation of selector genes having become what has bad effectiveness from thing of Genes gag and pol.

10. A packaging cell given in any 1 term of claims 7–9 characterized by the promotor who controls Genes gag and pol being LTR of friend B29 virus.

11. Also Contain Selector Genes in which 2nd Vector Differs from Thing on 1st Vector Similarly. [whether said selector genes are in the place of about 100 base pairs from the halt codon of pol, and] Or a packaging cell given in any 1 term of claims 7–10 characterized by being under control of an IRES mold array, therefore initiation of a translation of selector genes having become what has bad effectiveness from the thing of Genes gag and pol.

12. In Recombination Retrovirus Vector Which Has Heterologous Gene Which Searches for the Manifestation within Target Cell Which Has Array Psi – Nucleotide Sequence Y to which the Manifestation Has Complemented Deficit Function with Packaging Intracellular;

– Insurance gene Z which draws destruction of the cell from which the manifestation under existence of the exogenous matter received transfection or infection depending on the case;

***** -- the recombination retrovirus vector characterized by things.

13. The vector according to claim 12 characterized by that X and Y, Y and Z, or Y and Z express only the same single gene and enabling selection of the packaging cell into which said vector contains the convenient introductory gene X.

14.a) At least – Gene X for a therapy under one control of a promotor;

– NUKUREOCHICHIDO array Y whose the manifestation of the complements a deficit function with packaging intracellular;

- Capsid-ized array psi;
- Infection or transfection of said cell by the recombination vector which has the insurance gene Z which draws destruction of the cell from which the manifestation under existence of the exogenous matter received transfection or infection depending on the case;

b) Selection of said cell within the culture medium which contains the matter which causes the death of a cell when Array Y is not discovered;

The acquisition approach of the packaging intracellular recombination virus of a high potency given in any 1 term of ***** claims 1-13.

15. The approach according to claim 14 characterized by for the place of about 100 base pairs having Array Y from the halt codon of X, being under control of an IRES mold array, therefore initiation of a translation of Array Y having become what has bad effectiveness from the thing of Array X.

16. The approach given [Arrays Y and Z] in any 1 term of same claims 14 and 15.

17. The approach given [the gene X for a therapy and Array Y] in same claim 14 or any 1 term of 16.

18. A cell is an approach given in any 1 term of claims 14-17 characterized by being the cell into which a thymidine kinase like the cell of the 143 B TK-system origin suffered a loss, Array Y being the thymidine kinase of HSV1-TK, or an array of one gene in that functional derivative, and a cell being chosen within a HAT medium at this time, and being destroyed under existence of ganciclovir or aciclovir when required.

19. Use of the packaging cell which must be destroyed before use of the target cell which a packaging cell carries out in this way, and by which it was converted into physis in use of a packaging cell given in any 1 term of claims 1-11 in the cocultivation approach of the target cell of the infectivity deficit retrovirus which has a convenient gene by the gene therapy produced by said packaging cell.

20. A target cell is use according to claim 19 which is the cell of immune systems, such as a hematopoietic stem cell or a lymph cell.

21. Use of a packaging cell given in any 1 term of claims 1-11 in preparation of the drugs for gene therapies.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

[Drawing 1]

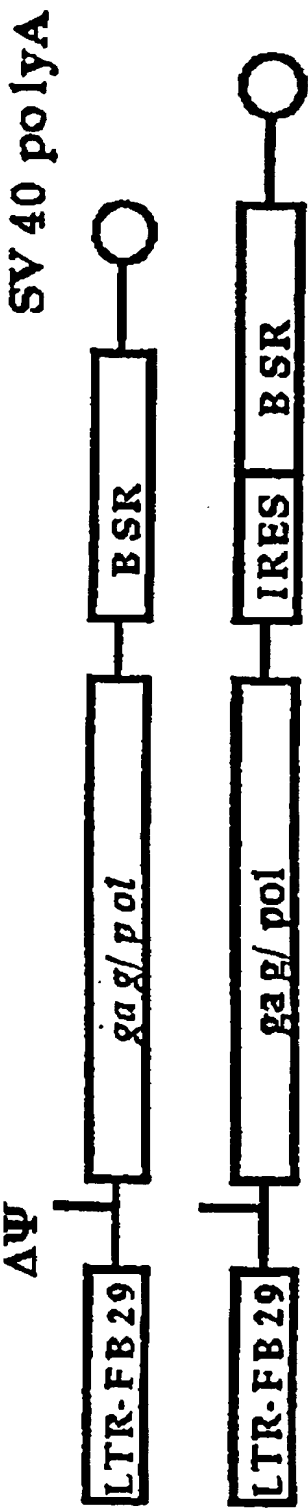


Fig. 1a

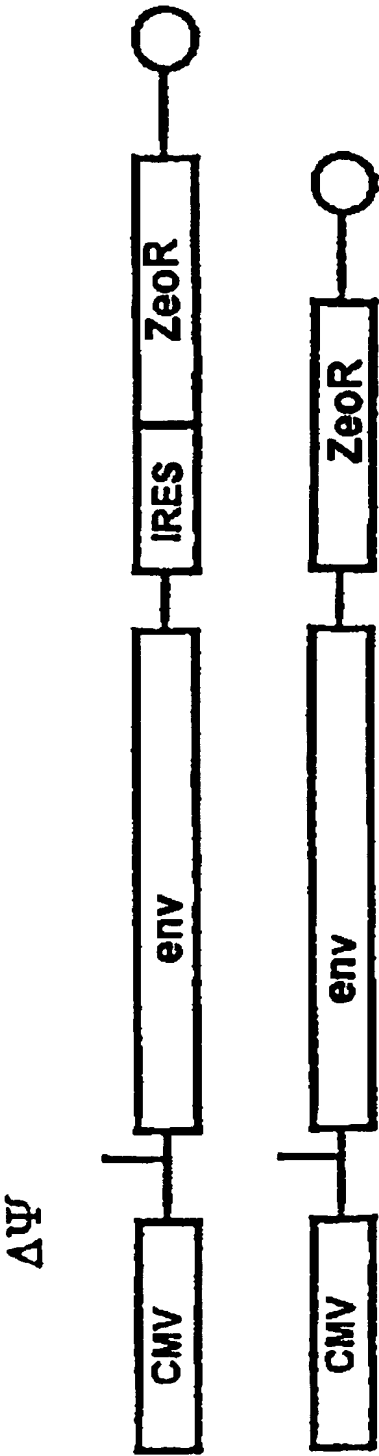


Fig. 1b

[Drawing 2]

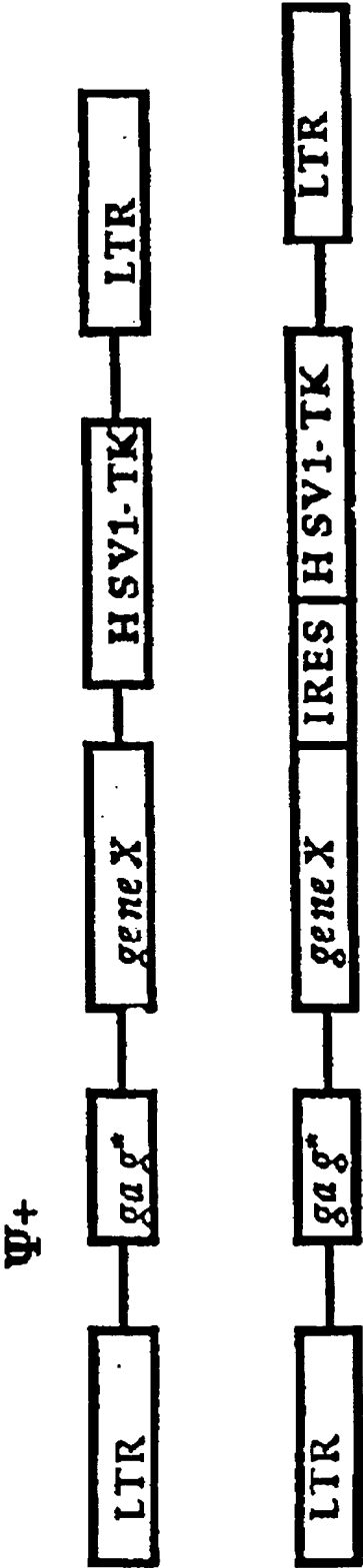


Fig. 2

[Translation done.]



P.B.5816 - Patentlaan 2
2280 HV Rijswijk (ZH)
☎ +31 70 340 2040
TX 31651 epo nl
FAX +31 70 340 3016

Europäisches
Patentamt

Zweigstelle
in Den Haag
Recherchen-
abteilung

European
Patent Office

Branch at
The Hague
Search
division

Office européen
des brevets

Département à
La Haye
Division de la
recherche

VOSSIUS & PARTNER
Siebertstrasse 4
81675 München
ALLEMAGNE

EINGEGANGEN

Vossius & Partner

27. Feb. 2003

Frist
bearb.:

Datum/Date

24.02.03

Zeichen/Ref./Réf.

F 3170 EP

Anmeldung Nr./Application No./Demande n°/Patent Nr./Patent No./Brevet n°.

00931647.2-2406-JP0003557

Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Propriétaire/Titulaire

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, et al

COMMUNICATION

The European Patent Office herewith transmits as an enclosure the European search report for the above-mentioned European patent application.

If applicable, copies of the documents cited in the European search report are attached.

☒ Additional set(s) of copies of the documents cited in the European search report is (are) enclosed as well.

REFUND OF THE SEARCH FEE

If applicable under Article 10 Rules relating to fees, a separate communication from the Receiving Section on the refund of the search fee will be sent later.





European Patent
Office

SUPPLEMENTARY EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number
EP 00 93 1647

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.CI.7)
Y	WO 98 02529 A (KLATZMANN DAVID ;SALZMANN JEAN LOUP (FR); UNIV PARIS CURIE (FR)) 22 January 1998 (1998-01-22) * page 9, line 7-25; claims 7-11; figure 1 * * page 10, line 4-6 * * page 11, line 8-24 *	1-15	C12N5/10 C12N15/48 C12N15/867 C12N7/01
Y	HOBBS S ET AL: "Development of a bicistronic vector driven by the human polypeptide chain elongation factor 1alpha promoter for creation of stable mammalian cell lines that express very high levels of recombinant proteins" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 252, no. 2, 18 November 1998 (1998-11-18), pages 368-372, XP002144790 ISSN: 0006-291X * the whole document *	1-15	
A	RIGG R J ET AL: "A NOVEL HUMAN AMPHOTROPIC PACKAGING CELL LINE: HIGH TILTER, COMPLEMENT RESISTANCE, AND IMPROVED SAFETY" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 218, no. 1, 1996, pages 290-295, XP000570621 ISSN: 0042-6822		TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.CI.7) C12N C07K
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 10 February 2003	Examiner Rutz, B
<p>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</p> <p>X: particularly relevant if taken alone Y: particularly relevant if combined with another document of the same category A: technological background O: non-written disclosure P: intermediate document</p> <p>T: theory or principle underlying the invention E: earlier patent document, but published on, or after the filing date D: document cited in the application L: document cited for other reasons &: member of the same patent family, corresponding document</p>			

2
EPO FORM 1503 (03.82) (P4/2001)



European Patent
Office

**SUPPLEMENTARY
EUROPEAN SEARCH REPORT**

Application Number
EP 00 93 1647

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (IntCl.7)
A	SWIFT S. ET AL.: "Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems" CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, SUPPLEMENT 31, 1999, pages 10.17.14-10.17.29, XP001135162		
A	YANG S ET AL: "GENERATION OF RETROVIRAL VECTOR FOR CLINICAL STUDIES USING TRANSIENT TRANSFECTION" HUMAN GENE THERAPY, XX, XX, vol. 10, no. 1, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 123-132, XP000949258 ISSN: 1043-0342		
A,D	PEAR W S ET AL: "PRODUCTION OF HIGH-TITER HELPER-FREE RETROVIRUSES BY TRANSIENT TRANSFECTION" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 90, 1 September 1993 (1993-09-01), pages 8392-8396, XP002017850 ISSN: 0027-8424		TECHNICAL FIELDS SEARCHED (IntCl.7)
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 10 February 2003	Examiner Rutz, B
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document		T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document	

EPO FORM 1503 03/02 (P0404)

**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 00 93 1647

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

10-02-2003

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9802529 A	22-01-1998	FR 2751345 A1	23-01-1998
		EP 0912723 A1	06-05-1999
		WO 9802529 A1	22-01-1998
		JP 2000514652 T	07-11-2000
		US 2002123146 A1	05-09-2002